

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular



**Conectividad funcional cerebral en personas mayores con
y sin deterioro cognitivo leve:
Correlatos de neuroimagen y marcadores en sangre**

Tesis Doctoral
presentada por

Gabriel González Escamilla

Dirigida por

Dr. José Luis Cantero Lorente

Dra. Mercedes Atienza Ruiz

Sevilla, 2015



D. José Luis Cantero Lorente y Dña. Mercedes Atienza Ruiz, ambos Profesores Titulares del área de Fisiología, del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, perteneciente a la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que D. Gabriel González Escamilla ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de Tesis titulado "*Conectividad funcional cerebral en personas mayores con y sin deterioro cognitivo leve: Correlatos de neuroimagen y marcadores en sangre*". Este trabajo reúne las condiciones académicas exigidas para optar al Grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Sevilla, a 13 de enero de 2015

Fdo.: Dr. José Luis Cantero Lorente

Fdo.: Dra. Mercedes Atienza Ruiz

Agradecimientos

Unas cuantas palabras nunca serán suficientes para agradecer todos aquellos momentos vividos en compañía de otros. Sin embargo, siento la necesidad de expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una manera u otra, me han acompañado durante la realización de este trabajo.

Qué sería de esta Tesis sin sus Directores, pendientes de que todo avanzara por el camino correcto, de que el trabajo siempre fuera de la mejor calidad, y dedicados fervientemente a una misión tan dura y llena de retos y frustraciones como la de guiar a alumnos en sus primeros años de carrera investigadora. Estas palabras hacen referencia a José Luis y Mercedes, investigadores que además de ser mis tutores han sido guías inmejorables durante todos estos años, un camino que gracias a sus consejos espero poder continuar por mí mismo, y con su ejemplo, poder afrontar de la mejor manera posible. Gracias por su tiempo, dedicación y comprensión, por su paciencia infinita y apoyo durante estos años. Gracias especialmente a José Luis, por haberme ofrecido la oportunidad de emprender este camino tan apasionante y por todos sus consejos, estoy seguro que me ayudarán a seguir dando lo mejor de mí en los siguientes años. Gracias a Mercedes, por brindarme esa calidez humana que, en la distancia del sitio que me vio crecer, me ha hecho sentir como en casa desde el primer momento.

Al hablar de la distancia, lo primero que me viene a la mente son todas aquellas personas que me han apoyado incondicionalmente y que han hecho que me sienta orgulloso de haber crecido con ellos, me refiero a mi familia. Ellos siempre están ahí cuando cierro los ojos, me han acompañado durante este camino y me han animado a seguir adelante. También quiero tener un recuerdo especial para Miguel y Abel, mis guías musicales que le han dado tanto ritmo a mi vida y que me han ayudado sin pretenderlo a tomar el camino que quería seguir. Siempre lo he dicho y lo diré: ¡Miguel, eres mi ejemplo a seguir! Aliz y Fercho, a esos dos pequeños latosos que han llenado de color mi vida, por recordarme que siempre hay más retos que superar, por enseñarme a desarrollar la tolerancia, ayudarme a cultivar la paciencia, y por inspirarme en lo que hago cada día. A Arturo, has sido mi mano derecha en todo lo que he necesitado. A mi mamá, no existen palabras de agradecimiento, se ha quitado de tanto para que yo pudiese seguir adelante con mis propósitos... Gracias por transmitirme su fuerza y enseñarme a luchar por lo que vale la pena. Gracias por traerme al mundo y ayudarme a ser la persona que actualmente soy. A mi abuela Olga, a Sandra y mamá Marichu, por recordarme que la familia no solo se lleva en la sangre y que es nuestra responsabilidad mantenernos cerca de las personas que queremos, incluso en la distancia. Y a mi abuelo Laurentino, por mostrarme la forma más crítica y divertida de ver la vida. Porque criticar no significa despreciar, sino aprender.

Gracias a mis compis del Laboratorio por todos los momentos que hemos pasado juntos. A Maité, por ser tan paciente cuando estaba dando mis primeros pasos y enseñarme tantas cosas, por confiar siempre en mi criterio e ilustrarme con su sabiduría. A Kelly, iniciar este reto sin haberla tenido a mi lado no hubiese sido lo mismo. Ambas me ofrecieron su amistad y eso nunca podré agradecerlo con palabras. A Sofi, por hacerme sonreír sin importar lo bien o mal que vaya todo en el día a día. A Rafa, por mostrarme, sin pretenderlo y de forma muy peculiar, la mejor manera de hacer las cosas. A Esther y Eva, por esos momentos que, por simples que parecieran, fueron de contenido inmejorable. A Laura y Mayely, por ser tan inocentes y recordarme que no todo en la vida debe ser seriedad. Y a tantos otros que han pasado por el Laboratorio y que han contribuido de alguna forma a mi experiencia enormemente grata por aquí.

En realidad, hay otras muchas personas a quienes me gustaría mencionar. A Irene, por mostrarme que uno nunca está solo en lo que hace, siempre habrá alguien a tu lado dándote soporte y consuelo, aunque a veces no puedas verle. A Maciek y a Darío, por recordarme que todo lo que hacemos debe ser divertido y ayudarme a apreciar el gusto por la vida. A Noé, Carmen y Javi, Lety, Javi y Ana, Rafa y Llanos, Ale y Luis, Mario y Nacho. Estos años me habéis hecho sentir como en casa y os he sentido como mi familia. A Melani y Luis, por proporcionarme tanto apoyo en tan poco tiempo. Gracias a Kike, a Daniel y Miriam, a Tere, Bris, Lorelí, Thalía, Cindy, Tanus, y a muchos otros que siempre, o al menos desde que tengo memoria, han formado parte de mi vida y me han transmitido su apoyo. A Edu, porque sin él, mis primeros pasos en España no hubiesen sido siquiera la mitad de buenos, gracias por todos los consejos que me has dado, por creer en mí, por apoyarme y por ser un modelo para mí.

Por último, quiero agradecer a otras personas que he conocido en este trayecto y que han compartido conmigo sus experiencias, ayudándome en grandes y pequeñas cosas. De entre ellas, me gustaría destacar a mi nueva familia, Maribel y Thomas, por haberme hecho sentir como uno más de su familia desde el primer momento, por ser tan buenos y bondadosos, y por haberme dado una de las cosas que más aprecio en este mundo, Yasmin, presente en cada minuto de mi vida. Ella me ha enseñado que la vida toma rumbos inesperados en los momentos más oportunos, y que siempre hay una forma de disfrutarlos.

Gracias a todos. De todo corazón y desde lo más profundo de mi ser.

*"No deben preocuparnos las arrugas del rostro sino las del cerebro.
Estas no las refleja el espejo, pero las perciben nuestros amigos, discípulos y lectores..."*

El mundo visto a los 80 años

Santiago Ramon y Cajal

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	13
2.1. Antecedentes históricos de la conectividad cerebral	15
2.2. Escalas espaciales de la conectividad cerebral	16
2.3. Tipos de conectividad cerebral	19
2.4. Aproximaciones analíticas al estudio de la conectividad funcional cerebral	22
2.5. Efectos del envejecimiento normal sobre la conectividad funcional cerebral	26
2.6. Efectos del DCL sobre la conectividad funcional cerebral	29
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	39
3.1. Objetivos	39
3.2. Hipótesis	40
3.2.1. Hipótesis I	40
3.2.2. Hipótesis II	41
3.2.3. Hipótesis III	42
3.2.4. Hipótesis IV	43
4. MATERIALES Y MÉTODOS	47
4.1. Sujetos	47
4.2. Genotipado del gen ApoE	50
4.3. Determinación de los niveles de A β en sangre	51
4.4. Determinación de los niveles de lípidos en sangre	51
4.5. Adquisición y post-procesamiento de los registros de EEG	52
4.6. Determinación de los patrones de conectividad funcional EEG	55
4.7. Adquisición y post-procesamiento de las imágenes de RM cerebral	58
4.8. Adquisición y post-procesamiento de las imágenes de PET-FDG cerebral	59
4.9. Delimitación anatómica de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa	60
4.10. Análisis de morfometría basada en vóxel (VBM)	61
4.11. Procesamiento longitudinal de las imágenes de RM y PET-FDG cerebral	62
4.12. Análisis estadísticos	64

5. RESULTADOS	71
5.1. Características demográficas y cognitivas	71
5.2. Diferencias de grupo en los niveles de A β y lípidos en sangre	72
5.3. Diferencias de grupo en los niveles de conectividad funcional EEG	73
5.4. Diferencias de grupo en el volumen y consumo de glucosa cerebral	76
5.5. Relación entre los cambios de conectividad funcional EEG y el volumen cerebral	80
5.6. Relación entre los cambios de conectividad funcional EEG y el consumo de glucosa cerebral	85
5.7. Relación entre los niveles de A β en sangre y los cambios de conectividad funcional EEG, volumen cerebral y consumo de glucosa cerebral	88
5.8. Relación entre los niveles de lípidos en sangre y los cambios de conectividad funcional EEG, volumen y consumo de glucosa cerebral	89
5.9. Evolución temporal de los diferentes marcadores	91
5.9.1. Marcadores cognitivos	93
5.9.2. Marcadores de A β y lípidos en sangre	93
5.9.3. Marcadores de conectividad funcional EEG	93
5.9.4. Marcadores neuroanatómicos y de consumo de glucosa cerebral	94
6. DISCUSIÓN	97
6.1. Correlatos neuroanatómicos del deterioro de la conectividad funcional EEG en personas mayores con DCLa	99
6.2. Relación entre la integridad de los generadores cerebrales del ritmo alfa y el deterioro de la conectividad funcional EEG en personas mayores con DCLa	103
6.3. El deterioro de la conectividad funcional EEG difiere entre DCLa portadores y no portadores del genotipo ApoE ϵ 4	105
6.4. Relación entre los niveles de A β en sangre y el deterioro de la conectividad funcional EEG en personas mayores con DCLa	107
6.5. Relación entre los niveles de lípidos en sangre y el deterioro de la conectividad funcional EEG en personas mayores con DCLa	109
6.6. Relevancia de los diferentes marcadores como predictores de la EA	111
6.7. Limitaciones del estudio	114
7. CONCLUSIONES	119
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
9. ANEXO I. PUBLICACIONES	147
9.1. Artículo 1. Impaired cortical oscillatory coupling in mild cognitive impairment: anatomical substrate and ApoE4 effects	147
9.2. Artículo 2. Cerebral and blood correlates of reduced functional connectivity in mild cognitive impairment	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Organización celular de la corteza cerebral y del hipocampo según Santiago Ramón y Cajal.	16
Figura 2.	Escalas espaciales de la conectividad cerebral y niveles de análisis de la conectividad funcional.	17
Figura 3.	Neuropatología de la EA.	31
Figura 4.	Montaje de electrodos EEG.	53
Figura 5.	Diagrama ilustrativo de la metodología de análisis de la conectividad funcional EEG, post-procesamiento y análisis estadístico de las imágenes de RM y PET-FDG cerebral.	56
Figura 6.	Diferencias de grupo en los niveles de acoplamiento de fase del ritmo alfa.	75
Figura 7.	Diferencias de grupo a nivel neuroanatómico (RM).	77
Figura 8.	Diferencias de grupo en el consumo de glucosa cerebral (PET-FDG).	79
Figura 9.	Diferencias de grupo en los patrones de correlación entre conectividad funcional EEG y volumen de SG cortical.	81
Figura 10.	Diferencias de grupo en los patrones de correlación entre conectividad funcional EEG y volumen de SG de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa.	83
Figura 11.	Diferencias de grupo en los patrones de correlación entre conectividad funcional EEG y volumen de la SB cerebral.	84
Figura 12.	Diferencias de grupo en los patrones de correlación entre conectividad funcional EEG y volumen de SG cortical.	86
Figura 13.	Diferencias de grupo en los patrones de correlación entre conectividad funcional EEG y consumo de glucosa de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa.	87
Figura 14.	Correlaciones entre las concentraciones de A β /lípidos en sangre y los niveles de conectividad funcional EEG.	89
Figura 15.	Correlaciones entre las concentraciones de triglicéridos y el volumen de SG de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa.	90
Figura 16.	Evolución temporal de los diferentes marcadores en sujetos cDCLa y ncDCL.	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características demográficas y cognitivas.	71
Tabla 2.	Diferencias de grupo en los niveles de A β y lípidos en sangre.	73
Tabla 3.	Diferencias de grupo en el volumen cerebral (RM).	78
Tabla 4.	Diferencias de grupo en el consumo de glucosa cerebral (PET-FDG).	79
Tabla 5.	Diferencias de grupo en las correlaciones entre los niveles de conectividad funcional EEG y el volumen de SG.	82
Tabla 6.	Diferencias de grupo en las correlaciones entre los niveles de conectividad funcional EEG y el volumen de SB cerebral.	85
Tabla 7.	Diferencias de grupo en las correlaciones entre los niveles de conectividad funcional EEG y el consumo de glucosa cerebral (PET-FDG).	87
Tabla 8.	Diferencias de grupo (CN+ > DCLa-) en las correlaciones entre los niveles de triglicéridos en sangre y el consumo de glucosa (PET-FDG) de los generadores del ritmo alfa.	91

1. RESUMEN

1. RESUMEN

Las personas mayores con deterioro cognitivo leve de tipo amnésico (DCLa) desarrollan la enfermedad de Alzheimer (EA) con mayor frecuencia y rapidez que las que no presentan este síndrome. Por otra parte, diversos estudios han mostrado que los oligómeros solubles de beta-amiloide ($A\beta$) son más sinaptotóxicos que los propios agregados de $A\beta$, por lo que podrían ser los primeros responsables de las disfunciones sinápticas que caracterizan a las fases más tempranas de la EA. Dado que las neuronas piramidales se muestran especialmente vulnerables ante este tipo de lesiones, incluso años antes de que se produzca el diagnóstico clínico de la EA, es razonable predecir que las oscilaciones electroencefalográficas (EEG) y, por ende, sus correlatos cerebrales y periféricos, derivados de la neuroimagen cerebral y de los marcadores en sangre respectivamente, mostrarán perfiles capaces de distinguir a las personas con DCLa de los mayores sanos.

Con el objetivo de arrojar luz sobre estas cuestiones, se han analizado los patrones de conectividad funcional EEG del ritmo alfa (7,5-12,5 Hz) registrados en el estado de vigilia relajada con ojos cerrados, se han adquirido imágenes estructurales de resonancia magnética (RM) cerebral y funcionales mediante tomografía por emisión de positrones (PET) empleando el radiotrazador 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucosa (FDG), y también se han determinado los niveles en sangre de $A\beta$ y de lípidos en 26 personas mayores que no presentaban alteraciones neurológicas ni cognitivas (controles normales, CN) y en 29 personas mayores con DCLa. Además, se ha realizado un seguimiento del grupo con DCLa transcurridos dos años, con el fin de estudiar la evolución de la conectividad funcional EEG y del resto de biomarcadores en aquellos DCLa que convirtieron a EA (cDCLa) y en los que permanecieron estables (ncDCLa).

Los resultados mostraron que los individuos con DCLa presentan un hipometabolismo del precúneo y una atrofia del tálamo, dos estructuras cerebrales imprescindibles en la generación neuroeléctrica del ritmo alfa. En consonancia con estos hallazgos, los sujetos con DCLa mostraron un deterioro de la conectividad funcional EEG que afectó fundamentalmente a regiones parieto-temporales, mientras que los DCLa portadores del genotipo ApoE $\epsilon 4$ —factor

de riesgo genético más importante en la EA— mostraron una disminución de la conectividad funcional EEG que alteró la coordinación inter-hemisférica entre regiones del lóbulo frontal, patrón de conectividad que también permitió diferenciar a nivel basal a los cDCLa de los ncDCLa. Si bien los marcadores cognitivos y las concentraciones de A β en sangre se vieron afectados con el paso del tiempo en los cDCLa, la conectividad funcional EEG no sufrió cambios durante la progresión de la enfermedad. Por otra parte, los análisis de regresión revelaron que las alteraciones de la conectividad funcional EEG mostradas por los sujetos con DCLa se asocian con cambios de volumen de la sustancia gris (SG) en regiones del lóbulo parietal como el precúneo y el giro angular, y con cambios de volumen de la sustancia blanca (SB) en el esplenio del cuerpo calloso. Además, los individuos con DCLa mostraron una relación entre el incremento de la concentración de colesterol HDL y el aumento de los niveles de acoplamiento de fase del ritmo alfa, y una asociación entre el incremento de los niveles de triglicéridos y la disminución bilateral del volumen de SG del precúneo.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los cambios en los circuitos anatómo-funcionales implicados en la generación del ritmo alfa difieren sustancialmente entre personas mayores con y sin DCLa, entre DCLa portadores y no portadores del genotipo ApoE ϵ 4, y entre sujetos con DCLa que desarrollan la EA y aquellos que permanecen estables transcurridos dos años; posiblemente como resultado de la vulnerabilidad mostrada por las neuronas piramidales corticales y las regiones cerebrales responsables de la generación del ritmo alfa ante los oligómeros solubles de A β . Por último, y de acuerdo con la relación existente entre la regulación de la homeostasis del colesterol y la amiloidogénesis, nuestros resultados subrayan el efecto negativo de los triglicéridos sobre la integridad anatómica de estructuras cerebrales implicadas en la generación del ritmo alfa, así como el posible papel neuroprotector del colesterol HDL sobre la integridad de la circuitería funcional de la corteza cerebral en personas con DCLa, aspecto que podría ser potenciado a través de la dieta en personas mayores en alto riesgo de desarrollar EA.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales logros de la neurociencia contemporánea ha consistido en poner de manifiesto la naturaleza dinámica de las conexiones cerebrales, tanto anatómicas como funcionales. Estos cambios de conectividad cerebral se producen en diferentes escalas espaciales y temporales, y se ven afectados por el desarrollo normal del cerebro, las influencias ambientales, el aprendizaje, el envejecimiento, y por patologías cerebrales crónicas, como es el caso de las enfermedades neurodegenerativas.

Los avances tecnológicos de las últimas décadas nos han permitido acceder mediante técnicas *in vivo* a la realidad anatómica de los tractos de fibras nerviosas, tanto en condiciones normales como patológicas (Sundgren *et al.*, 2004; Mori & Zhang, 2006; Le Bihan & Johansen-Berg, 2012). Estos avances han contribuido a revelar que, por ejemplo, en los primeros años de vida, las conexiones sinápticas de los circuitos locales maduran más rápidamente que aquellas que conectan regiones cerebrales distantes (Yap *et al.*, 2011; Tymofiyeva *et al.*, 2013), y que la organización cerebral es de carácter modular (Chen *et al.*, 2008; Meunier *et al.*, 2009). Gracias a estos avances, sabemos también que determinadas regiones cerebrales actúan como verdaderos centros de integración de la información ("hubs"), tanto a nivel local como global (Rubinov & Sporns, 2010). El delicado equilibrio entre segregación e integración cerebral es, sin duda, uno de los principales fundamentos de su reducido gasto metabólico, incluso en situaciones de procesamiento muy demandantes (Achard & Bullmore, 2007; Hagmann *et al.*, 2008). De hecho, el envejecimiento produce una disminución progresiva de este equilibrio, lo que conduce irreversiblemente a una reducción de la eficiencia de procesamiento en la red cerebral (Wu *et al.*, 2012; Montembeault *et al.*, 2012). No es de extrañar, por tanto, que los mecanismos que mantienen el equilibrio entre segregación e integración se vuelvan especialmente vulnerables ante la presencia de enfermedades neurodegenerativas (e.g., He *et al.*, 2009; Sanz-Arigita *et al.*, 2010; Olde Dubbelink *et al.*, 2014).

Profundizar en el sustrato anatómico de las conexiones cerebrales es un primer paso para entender su funcionamiento, pero descifrar los códigos neurales que subyacen a la percepción, actos motores o funciones cognitivas complejas en humanos es una de las principales metas de la neurociencia. Gracias a las técnicas de registro *in vivo* de la actividad cerebral y a las técnicas de análisis para cuantificar su conectividad funcional, se han identificado circuitos neuronales implicados en procesos tan complejos como la atención, la memoria, el lenguaje, la recompensa o la creatividad. Todas las evidencias apuntan a que estos circuitos dependen de la activación estratégica de patrones de conectividad funcional entre regiones cerebrales concretas (e.g., Crespo-García *et al.*, 2010; Salimpoor *et al.*, 2013; Margulies & Petrides, 2013; Pinho *et al.*, 2014), y que su integridad está comprometida en diversas patologías cerebrales (e.g., Leuchter *et al.*, 1992; Dinstein *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2013; Baker *et al.*, 2014).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, hemos tratado de describir los cambios que sufren los circuitos funcionales corticales que caracterizan al estado de reposo cerebral durante el envejecimiento normal y el asociado al DCLa. Dadas las relaciones emergentes entre la estructura y función cerebral asociadas al propio fenómeno del envejecimiento (Romero-García *et al.*, 2014), hemos puesto especial énfasis en establecer el sustrato anatómico de estos patrones de conectividad funcional EEG, y en determinar algunos de los correlatos en sangre periférica del deterioro de la conectividad funcional asociados a cada trayectoria de envejecimiento.

A continuación revisaremos la evolución del concepto de conectividad cerebral en general, y el de conectividad funcional en particular, remontándonos a los trabajos pioneros de Santiago Ramón y Cajal hasta llegar a las aproximaciones de análisis más sofisticadas de nuestros días. Finalmente, revisaremos cómo los procesos de envejecimiento normal y aquellos asociados al DCLa alteran los circuitos funcionales cerebrales, y repasaremos algunos de los factores que podrían estar precipitando estos cambios en la circuitería cerebral.

2.1. Antecedentes históricos de la conectividad cerebral

Los primeros estudios que aproximaron de forma experimental el problema de la conectividad cerebral fueron desarrollados hace más de un siglo por el neurocientífico Santiago Ramón y Cajal (Cajal, 1909-1911). Estos trabajos, plenamente vigentes en la actualidad, han contribuido de forma esencial a entender la comunicación entre neuronas y la estrecha relación existente entre las conexiones sinápticas y la integridad de funciones sensoriales, cognitivas y motoras (Kandel *et al.*, 2000; Squire *et al.*, 2008). Cajal, mediante la utilización del método de Golgi, realizó una detallada descripción de la organización celular de la corteza cerebral, mostrando la estructura y conexiones de las diferentes neuronas, su organización dendrítica y axonal, y la disposición de los haces de fibras aferentes y eferentes. La Figura 1A muestra un dibujo de las neuronas piramidales de la corteza cerebral humana realizado por Cajal, neuronas que por su delicada y elegante morfología él denominaba "mariposas del alma" (Cajal, 1909-1911). La Figura 1B muestra un dibujo esquemático de las conexiones sinápticas y el flujo de información de los circuitos corticales, tal como Cajal propuso originalmente (Cajal, 1933).

Sus observaciones no se limitaron a la corteza, sino que se extendieron al hipocampo, estructura en la que describió la organización estratificada de sus sistemas aferentes, destacando la organización en capas del hipocampo y poniendo de manifiesto la capacidad de una misma neurona del hipocampo para realizar sinapsis sobre un amplio número de células nerviosas distribuidas por diferentes regiones. Siendo fiel a su principio de polarización axonal, Cajal describió por primera vez cómo fluía la actividad nerviosa en el hipocampo, circuitos sinápticos que siguen vigentes en la actualidad (Cajal, 1893). La Figura 1C muestra un dibujo esquemático de las conexiones sinápticas y el flujo de información de los circuitos neuronales intrínsecos del hipocampo (Cajal, 1893). Tomados en conjunto, estos trabajos de la corteza y el hipocampo constituyen los primeros mapas de conectividad cerebral que se conocen (DeFelipe, 2010).

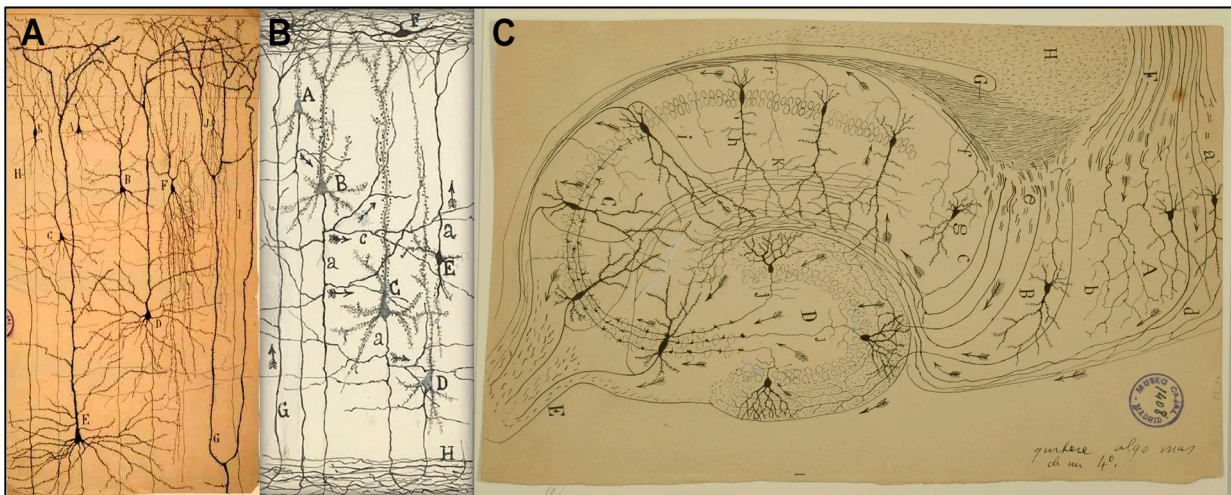


Figura 1. Organización celular de la corteza cerebral y del hipocampo según Santiago Ramón y Cajal. **A.** Dibujo de las neuronas piramidales de la corteza cerebral humana. **B.** Esquema del flujo de información de las conexiones sinápticas corticales. **C.** Esquema del flujo de información de los circuitos neuronales del hipocampo (Herederos de Santiago Ramón y Cajal®).

2.2. Escalas espaciales de la conectividad cerebral

El cerebro humano contiene aproximadamente 100 billones de neuronas con potencial para realizar 100 trillones de conexiones sinápticas (Herculano-Houzel, 2012). Esta organización genera patrones de sincronización entre pares de neuronas, columnas corticales y regiones cerebrales, reflejando cada uno de estos fenómenos diferentes niveles de integración neuronal (Buzsaki *et al.*, 2012). Por lo tanto, es posible estudiar la conectividad cerebral en varias escalas de organización neural empleando diferentes técnicas de registro y análisis (Varela *et al.*, 2001; Lemieux *et al.*, 2011). La Figura 2A representa de forma esquemática diferentes escalas espaciales de la conectividad cerebral, mientras que la Figura 2B muestra los diferentes niveles de integración neuronal desde los que es posible evaluar la conectividad funcional desde un punto de vista electrofisiológico.

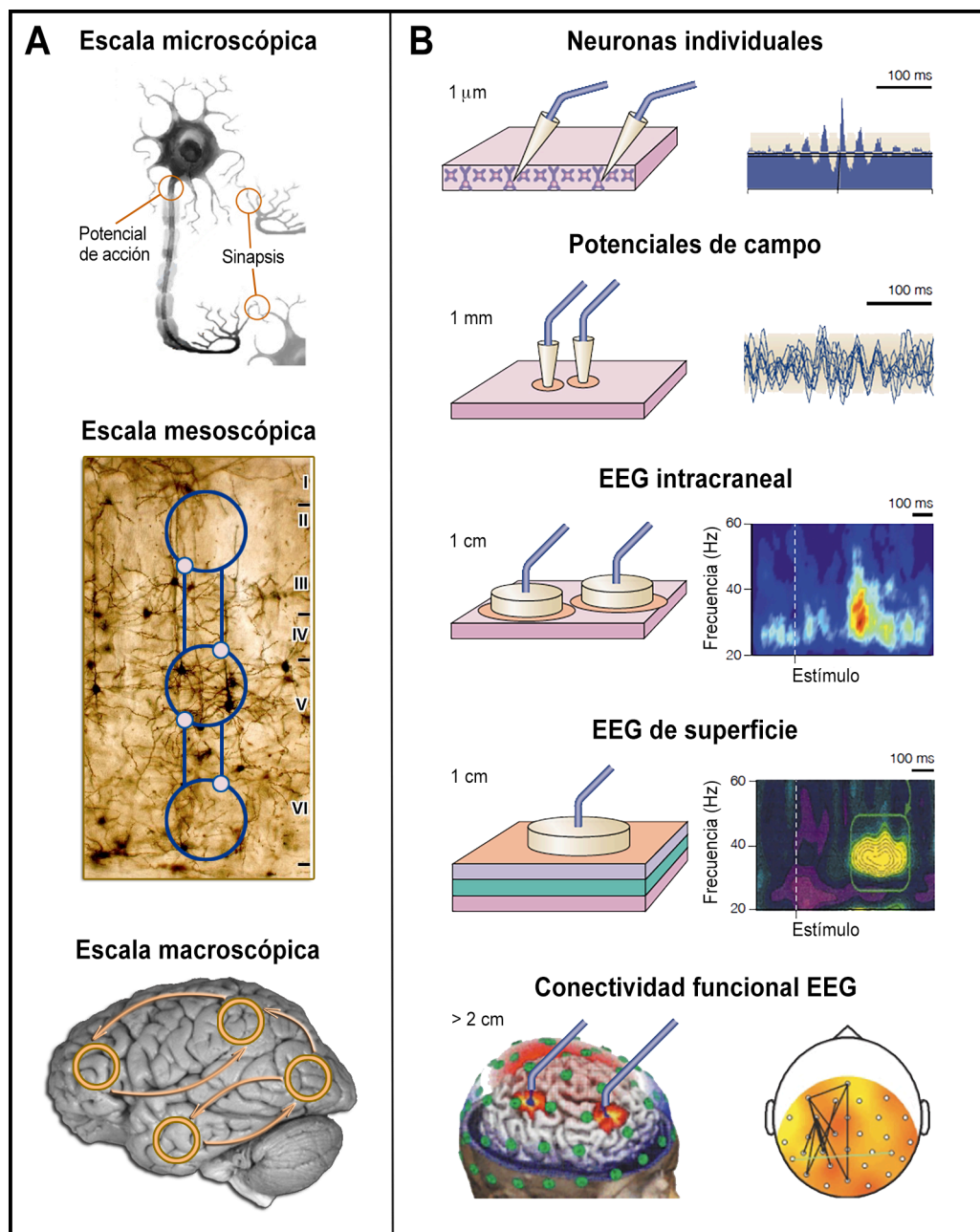


Figura 2. Escalas espaciales de la conectividad cerebral y niveles de análisis de la conectividad funcional. **A.** Escalas espaciales de la conectividad cerebral (Figura modificada de Lemieux *et al.*, 2011). **B.** Diferentes niveles de integración neuronal en la conectividad funcional electrofisiológica (Figura modificada de Varela *et al.*, 2001).

La escala *microscópica* nos permite describir la actividad, intrínseca o asociada a eventos, de células nerviosas individuales (e.g., neuronas y glía) y de sus diferentes compartimentos (e.g.,

axón y sinapsis). Un claro ejemplo lo constituyen los potenciales de acción de las neuronas de la corteza prefrontal dorsolateral ante la presencia de caras (O Scailidhe *et al.*, 1997) o la modulación de los potenciales de acción de las neuronas corticales y células de la glía durante los diferentes estados cerebrales que componen el ciclo vigilia-sueño (Amzica & Steriade, 2000). La mayor parte de estos estudios se realizan mediante registros con micro-electrodos, trazadores neuronales, inyecciones intracelulares, y microscopía electrónica, siendo posible identificar tanto los contactos sinápticos de un circuito local como el número de espinas dendríticas de cada neurona con una resolución del micrómetro cúbico (Mishchenko *et al.*, 2010).

La escala *mesoscópica* es un fiel reflejo de la transición entre la variabilidad anátomo-funcional que caracteriza a la escala microscópica y la estabilidad propia de la especie intrínseca a la escala macroscópica (Mitra, 2014). A nivel funcional, esta escala refleja la actividad sincronizada de grupos locales de neuronas (entre 100 y 10.000; separadas entre 250 μ m y 3 mm) contenida en los potenciales de campo (Kreiman *et al.*, 2006; Katzner *et al.*, 2009). Este fenómeno constituye en sí mismo un primer nivel de integración neuronal, ya que las oscilaciones resultantes contienen información tanto de la modulación temporal de los potenciales de acción de neuronas individuales como de los efectos ejercidos por otros circuitos locales (Denker *et al.*, 2011). Un ejemplo de conectividad en la escala mesoscópica podemos verlo en las poblaciones de neuronas de diferentes mini-columnas corticales que tienden a disparar de forma sincrónica cuando comparten propiedades físicas de un mismo estímulo visual (Gray *et al.*, 1989). Generalmente, estos estudios utilizan multi-electrodos extracelulares para registrar la actividad simultánea de diferentes poblaciones neuronales y cuantificar las relaciones funcionales entre ellas (Hammerle *et al.*, 1994).

Finalmente, la escala *macroscópica* permite describir la actividad sumada de corrientes postsinápticas de neuronas piramidales de la corteza cerebral (Hadjipapas *et al.*, 2009), mostrando niveles de coordinación funcional entre regiones corticales separadas por más de 2 cm (Varela *et al.*, 2001). Un ejemplo de conectividad funcional en la escala macroscópica es la

correlación existente entre la actividad de la corteza parietal y temporal al identificar correctamente estímulos previamente presentados durante la fase de entrenamiento de una tarea de memoria (Takahashi *et al.*, 2008). La conectividad funcional en la escala macroscópica se puede cuantificar mediante técnicas no invasivas capaces de registrar los campos electromagnéticos generados por las células nerviosas de la corteza cerebral, como la electroencefalografía (EEG) y la magnetoencefalografía (MEG), o el consumo metabólico relacionado con la actividad neuronal, como la tomografía por emisión de positrones (*Positron Emission Tomography*, PET, siglas en inglés) y la resonancia magnética funcional (RMf) (Toga & Mazziotta, 2002).

En humanos, la conectividad funcional del cerebro a nivel macroscópico se ve afectada por diferentes condiciones naturales, como la experiencia (Klavrir *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014), el estado cerebral (Norton *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2014), la edad (Smit *et al.*, 2012), y también por diversas patologías cerebrales (Daimoiseaux *et al.*, 2009; Dinstein *et al.*, 2011; Szewczyk-Krolkowski *et al.*, 2014). Dado que los objetivos de esta Tesis Doctoral se relacionan con esta escala espacial de conectividad funcional, los siguientes apartados se centrarán fundamentalmente en la conectividad cerebral a nivel macroscópico.

2.3. Tipos de conectividad cerebral

Como se ha introducido anteriormente, la conectividad cerebral puede evaluarse a nivel estructural y funcional. La *conectividad estructural* revela relaciones estructurales entre diferentes regiones cerebrales, haciendo referencia tanto a conexiones anatómicas como a correlaciones morfométricas (He & Evans, 2010). En la actualidad, la conectividad estructural del cerebro humano se evalúa principalmente a partir de imágenes por tensor de difusión (*Diffusion Tensor Imaging*, DTI, siglas en inglés). Esta técnica cuantifica la dirección de la difusión de las moléculas de agua del tejido cerebral al someterlas a un campo magnético constante y a determinados pulsos de radiofrecuencia (Basser *et al.*, 1994). Dado que las

moléculas de agua difunden con mayor facilidad en los axones mielinizados, la DTI detecta la anisotropía producida por la movilidad de estas moléculas de agua en los tractos de fibras nerviosas compuestos por estos axones, permitiendo reconstruir sus trayectorias más probables a partir de los mapas de anisotropía, procedimiento conocido como tractografía. A partir de los resultados derivados de esta técnica, es posible delinear los grandes tractos de fibras nerviosas que conectan las diferentes regiones cerebrales, además de obtener información relevante sobre la integridad de la SB de estos tractos en condiciones normales y patológicas (Mori & Zhang, 2006). Uno de los principales problemas asociados a la tractografía es su dificultad para modelar fibras entrecruzadas en un mismo vóxel, dado que los modelos basados en DTI asumen que cada vóxel contiene fibras con una única orientación axonal (Chung *et al.*, 2011). Esta limitación está comenzando a subsanarse con la aparición de nuevos modelos multi-fibras que mejoran la estimación de las fibras cruzadas (Landman *et al.*, 2012).

La conectividad estructural también se puede estimar a partir de las correlaciones estadísticas de descriptores morfológicos cerebrales, como el espesor, volumen o superficie. En estos estudios, las conexiones estructurales se establecen a partir de las correlaciones significativas entre pares de regiones cerebrales (Lo *et al.*, 2011). Cada uno de estos descriptores morfométricos genera un mapa diferente de conectividad estructural que revela aspectos específicos de la conectividad cerebral (Sanabria-Díaz *et al.*, 2010). El principal inconveniente de estos estudios radica en la dificultad para interpretar patrones de conectividad estructural que podrían no estar sustentados por conexiones anatómicas reales.

El término *conectividad funcional* se estableció originalmente a partir del análisis conjunto de trenes de potenciales de acción generados por diferentes neuronas, asumiéndose que cuanto mayor fuera la correlación temporal entre estos patrones de respuesta neuronal mayor sería la eficacia sináptica subyacente (Gerstein & Perkel, 1969). Dado que una neurona cortical puede realizar sinapsis con aproximadamente 10.000 neuronas y proyectar a otras 10.000 en un instante determinado, la conectividad funcional entre neuronas (o grupos de neuronas) depende en gran medida de la actividad de las neuronas que configuran ese circuito en un

momento concreto, actividad que puede ser intrínseca a un circuito cortical o fluctuar rápidamente ante las demandas del ambiente. En las neuronas de la corteza cerebral, estos cambios rápidos están modulados por la excitabilidad neuronal en circuitos locales y distantes, dando lugar a diferentes patrones de conectividad funcional ante situaciones concretas (Haider & McCormick, 2009). Esto hecho sustenta la idea de que diferentes grupos de neuronas pueden agruparse transitoriamente para formar un circuito funcional (“asamblea de neuronas”) con propiedades emergentes imposibles de inferir a partir de la actividad mostrada por cada neurona individual (Hebb, 1949).

La comunicación entre las neuronas que integran un circuito funcional se establece a través de la sincronización temporal de sus potenciales postsinápticos excitadores e inhibidores que conducen tanto a estados funcionales intrínsecos como a rápidas transiciones entre estos estados funcionales, aspecto que ha sido puesto de manifiesto con experimentos *in vivo* y con modelos computacionales (Makarenko & Llinás, 1998). Sin embargo, para que esta forma de comunicación sea eficiente ambas poblaciones de neuronas deben encontrarse en periodos de elevada excitabilidad (Fries, 2005). Dicho en otras palabras, se requiere que los potenciales de acción se sincronicen con los cambios rítmicos asociados a estos periodos de elevada excitabilidad neuronal. De esta forma, el éxito a la hora de procesar un estímulo concreto dependerá de cuán sincronizada esté la actividad de las neuronas encargadas de dicho procesamiento con los ritmos cerebrales subyacentes. Por ejemplo, supongamos que el pico de excitabilidad del grupo de neuronas responsable de procesar un estímulo estuviera asociado al valle de las oscilaciones de los potenciales de campo generados por otro grupo de neuronas. En este caso, el procesamiento del estímulo será más rápido si ocurre en fase con ese valle y más lento si ocurre en fase con el pico de dicha oscilación (Fries, 2005). Este mismo principio se aplicaría a la coordinación funcional entre regiones cerebrales distantes, no solo cuando el cerebro se encuentra desarrollando una tarea compleja (*e.g.*, Womelsdorf *et al.*, 2001; van Elswijk *et al.*, 2010) sino también en ausencia de actividad cognitiva evidente (*e.g.*, Ghosh *et al.*, 2008; Deco *et al.*, 2009).

La conectividad funcional puede clasificarse en *funcional* propiamente dicha, definida como el grado de coherencia temporal entre la actividad neuronal de regiones cerebrales distantes que no tienen por qué estar conectadas anatómicamente (Aertsen *et al.*, 1989; Friston *et al.*, 1993), y *efectiva*, conceptualizada como la influencia causal que ejerce la actividad de una región sobre la actividad de otra región cerebral (Friston, 1994; Friston, 2011). Ambos tipos de conectividad funcional proporcionan información sobre la distribución topográfica y la fuerza de las conexiones cerebrales dinámicas, y pueden cuantificarse mediante diferentes aproximaciones analíticas como las que se presentan a continuación.

2.4. Aproximaciones analíticas al estudio de la conectividad funcional cerebral

La conectividad funcional cerebral puede ser estimada en el dominio del tiempo o de la frecuencia mediante la utilización de coeficientes de correlación y/o diversas técnicas que cuantifican el grado de coherencia o la sincronización de fase entre oscilaciones neuronales (Schnitzler & Gross, 2005; Li *et al.*, 2009; Sakkalis *et al.*, 2011). Aunque estas técnicas pueden aplicarse tanto a registros EEG/MEG como a imágenes cerebrales de RMf (Frackowiak *et al.*, 2004), en este trabajo se ha analizado la conectividad funcional a partir de registros de EEG basal, por lo que este apartado se centrará fundamentalmente en las aproximaciones de análisis más empleadas en este contexto. Otro aspecto a tener en cuenta es si las oscilaciones entre las que se pretende calcular el grado de conectividad funcional se encuentran en el mismo rango de frecuencias o pertenecen a rangos de frecuencias distintos, ya que para cada uno de estos casos existen diferentes aproximaciones analíticas. A continuación, revisaremos las técnicas más utilizadas para medir la conectividad funcional cerebral en cada uno de estos supuestos.

El nivel de conectividad funcional entre señales EEG/MEG que oscilan en el mismo rango de frecuencias puede evaluarse mediante análisis de correlación lineal, coherencia, sincronía de fase e información mutua. Las *correlaciones* entre pares de señales EEG revelan el grado de

asociación estadística entre oscilaciones corticales en el dominio del tiempo (Brazier & Casby, 1952). En su forma más simple, la técnica de la *coherencia* proporciona información sobre la correlación lineal entre oscilaciones EEG registradas en diferentes regiones corticales en una banda de frecuencia concreta (Dummermuth & Molinari, 1991). Sin embargo, los resultados obtenidos con la técnica de la coherencia combinan información de potencia espectral (amplitud) y de fase de las oscilaciones EEG, por lo que es prácticamente imposible determinar si el grado de conectividad funcional EEG se debe a la influencia específica de un parámetro o de otro (Fein *et al.*, 1988). Estas técnicas de análisis se han ido sustituyendo progresivamente por otros procedimientos que permiten determinar el nivel de sincronización de fase entre oscilaciones registradas en diferentes localizaciones de la corteza cerebral, eliminándose así el problema derivado de la aplicación de la técnica de la coherencia.

Las técnicas de análisis basadas en la *sincronía de fase* permiten calcular el grado de acoplamiento entre las fases de pares de señales EEG (Lachaux *et al.*, 1999). Concretamente, el índice de retraso de fase (*Phase Lag Index*, PLI, siglas en inglés) cuantifica la consistencia de fase entre pares de señales EEG, basándose en la estimación de la latencia y en el retraso temporal entre las fases de ambas oscilaciones. En experimentos con datos simulados y registros reales, los resultados arrojados por esta técnica han mostrado una mayor sensibilidad para detectar sincronización entre oscilaciones EEG, una menor afectación por las condiciones de ruido y una mayor independencia de la referencia, al compararla con otras técnicas que cuantifican el grado de conectividad funcional a partir de registros EEG (Stam *et al.*, 2007). En conjunto, todas las técnicas revisadas en este apartado se han utilizado en un amplio número de estudios para estudiar las propiedades dinámicas de las redes cerebrales funcionales en diferentes escalas temporales (Doesburg *et al.*, 2008; Vourkas *et al.*, 2011; Martini *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013).

Las técnicas de análisis de *información mutua* basadas en la Teoría Matemática de la Comunicación (Shannon, 1948) son capaces de determinar la cantidad de información que contiene una señal a partir de la observación de otra señal, con el fin de establecer el grado de

asociación entre ellas. Estas técnicas, aplicadas a registros EEG (Jeong *et al.*, 2001) y a imágenes cerebrales de RMf, (Salvador *et al.*, 2007), conciben la conectividad funcional como cambios en la transmisión de la información entre regiones cerebrales. Por otra parte, la conectividad funcional también se ha beneficiado de otras técnicas como el análisis de componentes independientes (*Independent Component Analysis*, ICA, siglas en inglés) (Calhoun *et al.*, 2001; Beckmann & Smith, 2004) que ha contribuido a aislar diferentes circuitos funcionales asociados a distintos estados cerebrales y procesos cognitivos (Fox & Raichle, 2007; Smith *et al.*, 2009).

La conectividad efectiva se define como una combinación entre conectividad estructural y funcional, ya que describe las relaciones e influencias causales o direccionales (directas o indirectas) entre regiones cerebrales (Friston, 1994, 2011). Para calcular la conectividad efectiva en registros EEG/MEG, se han utilizado técnicas como el modelado causal dinámico (Kiebel *et al.*, 2009), que permite estimar los cambios en la integración funcional de regiones cerebrales a partir de inferencias bayesianas. Esta técnica de estimación estadística realiza un modelado espacio-temporal de las series temporales en términos de dinámicas neurobiológicas plausibles.

Existen otros modelos estadísticos más liberales para determinar la conectividad efectiva entre regiones cerebrales, como las técnicas de causalidad de Granger (Granger, 1969) o la transferencia de entropía (Schreiber, 2000). La causalidad de Granger establece que una serie temporal es la causante de los cambios observados en otra si el conocimiento del pasado de la primera contribuye significativamente a predecir lo que ocurre en la segunda. Este conocimiento se consigue ajustando los registros a un modelo autorregresivo para obtener una combinación lineal de valores temporales que permitan realizar tal predicción. A partir de los coeficientes del modelo autorregresivo, se han propuesto varios métodos para estimar los patrones de conectividad funcional cerebral. Por ejemplo, Kaminski & Blinowska (1991) desarrollaron la *función de transferencia dirigida* (*Directed Transfer Function*, DTF, siglas en inglés), una medida normalizada en el dominio de la frecuencia que cuantifica la influencia de

una región sobre la otra, aunque esta técnica no permite detectar conexiones indirectas entre sistemas neuronales. Por otra parte, Baccalá & Sameshima (2001) propusieron la técnica de la *coherencia dirigida parcial* (*Partial Directed Coherence*, PDC, siglas en inglés) que permite distinguir conexiones funcionales indirectas en el dominio de la frecuencia.

Una alternativa para medir la conectividad efectiva cerebral es la transferencia de entropía (Schreiber, 2000). La entropía de Shannon cuantifica la reducción de la incertidumbre en una variable. Por lo tanto, esta técnica mide la desviación existente entre la generalización de ambas series temporales utilizando la divergencia esperada entre las dos distribuciones. Esta técnica no asume ningún modelo en particular para medir la interacción entre las dos señales EEG, por lo que ha mostrado ser de gran utilidad cuando se buscan interacciones no-lineales desconocidas, aspecto que constituye una limitación en las técnicas basadas en la causalidad de Granger y en el modelado causal dinámico (Vicente *et al.*, 2011).

Estudios recientes han mostrado que el cerebro es capaz de integrar la información en diferentes escalas espacio-temporales, y que dicha integración podría estar gobernada por una jerarquía de interacciones entre oscilaciones neuronales de diferentes frecuencias (Lakatos *et al.*, 2005; Palva *et al.*, 2005). Las interacciones entre oscilaciones cerebrales de diferentes frecuencias podrían basarse en cambios sincrónicos de la potencia espectral de ambas oscilaciones, en cambios de fase o en relaciones de fase-amplitud (Jensen & Colgin, 2007). Esta última modalidad, además de ser la más utilizada (revisado en Canolty & Knight, 2010), ha servido para introducir el concepto anteriormente mencionado de organización jerárquica de las oscilaciones cerebrales (Lakatos *et al.*, 2005). Según esta hipótesis, la amplitud (o potencia espectral) de determinadas oscilaciones neuronales estaría modulada (dependencia estadística) por la fase de las oscilaciones más lentas. En base a esta hipótesis, se mostró, por ejemplo, que la fase de las oscilaciones delta del estado de vigilia se encuentra modulada por la amplitud de las oscilaciones theta, y la fase de theta por la amplitud de las oscilaciones gamma en la corteza auditiva primaria de monos (Lakatos *et al.*, 2005), o que la fase de las oscilaciones alfa modula la amplitud de gamma en el núcleo accumbens durante una tarea de

aprendizaje asociada a recompensas en pacientes neuroquirúrgicos (Cohen *et al.*, 2009). También existen evidencias de que la amplitud de las oscilaciones gamma es modulada por otras oscilaciones generadas en diferentes regiones de la corteza dependiendo de la modalidad sensorial del material empleado en la tarea (Voytek *et al.*, 2010). Hay trabajos que sugieren que esta organización jerárquica no solo se basa en las relaciones fase-amplitud. De hecho, recientemente se ha encontrado que las oscilaciones lentas que caracterizan al sueño de ondas lentas son capaces de coordinar la comunicación entre diferentes regiones de la corteza a partir de las relaciones de fase existentes entre los husos de sueño y las oscilaciones beta (Cox *et al.*, 2014). Sea cual sea el tipo de interacción entre oscilaciones cerebrales, la mayoría de estudios sugieren que las frecuencias más lentas se encargarían de modular la actividad oscilatoria de regiones cerebrales distantes en intervalos temporales largos, mientras que las oscilaciones más rápidas modularían las oscilaciones a nivel local en intervalos temporales de menor duración (von Stein & Sarnthein, 2000).

2.5. Efectos del envejecimiento normal sobre la conectividad funcional cerebral

El envejecimiento del organismo conlleva profundas alteraciones en funciones biológicas elementales que afectan no solo a la morfología y a la química cerebral sino también a procesos genéticos, moleculares y fisiológicos que mantienen la vida. El envejecimiento no resulta de procesos patológicos pero incrementa la vulnerabilidad a enfermedades crónicas, incidiendo negativamente sobre los mecanismos de respuesta ante el estrés celular que subyacen a la aparición de patologías muy diversas (Kourtis & Tavernarakis, 2011).

Los cambios neurológicos asociados al envejecimiento vienen determinados por una amalgama de procesos moleculares, celulares y fisiológicos que conducen al deterioro de las funciones cognitivas, sensoriales y motoras (Rodrigue & Raz, 2004; Park & Reuter-Lorenz, 2009). A nivel anatómico, el cerebro de una persona mayor de 65 años presenta un menor número de neuronas comparado con el cerebro de una persona más joven, hecho que se

traduce en una disminución de volumen, surcos más profundos y circunvoluciones menos pronunciadas (Craik & Salthouse, 2000). Durante el envejecimiento, las neuronas sufren cambios morfológicos importantes que incluyen un árbol dendrítico menos ramificado así como una menor densidad, volumen y distribución de sus espinas dendríticas (Dickstein *et al.*, 2007). La reducción de la arborización dendrítica juega un papel importante en el contexto del envejecimiento, ya que en este compartimento neuronal se produce la integración de sinapsis excitadoras e inhibitoras procedentes de otras neuronas, quedando por tanto afectada una amplia gama de funciones cognitivas.

Estudios de neuroimagen han mostrado que tanto el hipocampo como la corteza entorrinal son las estructuras cerebrales que muestran una reducción de volumen más acentuada durante el envejecimiento, lo que podría explicar en parte el deterioro de la memoria asociado a la edad (Raz, 2005; Fjell *et al.*, 2009). De hecho, la tasa anual de atrofia del hipocampo oscila entre el 0,8 y el 2% (Barnes *et al.*, 2009), mientras que la de la corteza entorrinal varía entre 0,3% y 2,4% (Fjell & Walhovd, 2010). El deterioro de la función sináptica no se distribuye uniformemente por la neocorteza durante el envejecimiento, siendo la corteza prefrontal una de las regiones más afectadas (Peters *et al.*, 2008). Este hecho correlaciona con la disminución de la velocidad de procesamiento y la afectación de la memoria de trabajo que caracteriza a las personas mayores (West, 1996), ambas funciones muy dependientes de la integridad de la corteza prefrontal. En conjunto, estos estudios sugieren que las neuronas y los circuitos del lóbulo frontal son especialmente vulnerables a los procesos de envejecimiento. Por otra parte, la conectividad estructural durante el envejecimiento afecta significativamente a aquellos circuitos corticales que participan en funciones cognitivas superiores, sobre todo en el procesamiento semántico del lenguaje y en el control ejecutivo (Chen *et al.*, 2011; Montembeault *et al.*, 2012).

Además de los cambios neuroanatómicos, el envejecimiento se acompaña de una serie de alteraciones neuroquímicas que alteran de forma significativa la función cerebral. Estudios realizados con espectroscopia de resonancia magnética de protones han revelado que

determinados marcadores de viabilidad neuronal, como el N-acetil-aspartato o la creatina, disminuyen en regiones prefrontales, occipitales y en el hipocampo a medida que nos hacemos mayores (Raz & Rodrigue, 2006). Otros trabajos realizados con la técnica del PET han mostrado una disminución de la densidad de receptores de dopamina (Iyo & Yamasaki, 1993; Wang *et al.*, 1998; Kaasinen *et al.*, 2000) y una reducción de los niveles de glutamato y de los diferentes receptores de la serotonina (Wong *et al.*, 1984; Chang *et al.*, 2009) durante el envejecimiento.

Estudios realizados en la última década sugieren que el envejecimiento también afecta de forma significativa a los circuitos funcionales que subyacen al estado de reposo cerebral (Fox & Raichle, 2007; van den Heuvel *et al.*, 2009), y que integran la denominada "red por defecto" (*default mode network*, DMN en terminología anglosajona). Esta red se caracteriza por mostrar un incremento de la conectividad funcional entre regiones corticales como el precúneo, cíngulo posterior, corteza frontal medial, temporal medial y parietal lateral durante el estado de vigilia relajada con ojos cerrados, y presenta una disminución de la actividad de cada uno de sus nodos y de sus patrones de conectividad funcional durante la realización de diversas tareas cognitivas (Greicius *et al.*, 2003). Las regiones corticales que integran la red por defecto participan además en funciones como la memoria de trabajo, la actividad mental introspectiva, el control ejecutivo y la planificación (Fair *et al.*, 2008), capacidades todas ellas especialmente afectadas durante el envejecimiento (Salthouse *et al.*, 2003). En este sentido, el deterioro de la función ejecutiva asociado al envejecimiento podría ser en parte una consecuencia de la pérdida de integridad de la microestructura de la SB que conecta a las regiones de la red por defecto (O'Sullivan *et al.*, 2001; Charlton *et al.*, 2006). Además, diversos estudios han mostrado que los nodos que integran dicha red se desactivan menos durante el envejecimiento, fenómeno que correlaciona con un mayor deterioro de la función ejecutiva, una menor velocidad de procesamiento y un deterioro de la memoria asociativa en las personas mayores (Andrews-Hanna *et al.*, 2007; Damoiseaux *et al.*, 2008; Grady *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Geerligs *et al.*, 2012).

Por otra parte, el envejecimiento produce un desequilibrio entre los elementos locales y globales de la red cortical (Wang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012). Esta idea encuentra soporte experimental en estudios de neuroimagen estructural que muestran que el deterioro cognitivo propio del envejecimiento normal no sólo correlaciona con una pérdida de conectividad local sino también con una afectación de la conectividad entre regiones corticales distantes (O'Sullivan *et al.*, 2001) que afecta fundamentalmente a regiones del lóbulo frontal y temporal (Achard & Bullmore, 2007). Más concretamente, el envejecimiento produce una segregación antero-posterior del circuito fronto-cingulado-parietal integrado en la red por defecto (Meunier *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011), mostrando un incremento de las conexiones intramodulares en regiones frontales y parietales, y una disminución de la conectividad intermodular. Estos resultados parecen no limitarse al estado de reposo cerebral, sino que también se observan durante las fases de codificación y recuperación de la memoria (Wang *et al.*, 2010).

2.6. Efectos del DCL sobre la conectividad funcional cerebral

En la sección anterior hemos revisado las alteraciones de la conectividad funcional cerebral asociada al envejecimiento normal. En este punto, es importante destacar que el envejecimiento en sí mismo constituye el factor de riesgo más importante para desarrollar EA. Se estima que a partir de los 65 años la incidencia de la EA incrementa exponencialmente, duplicándose cada cinco años (Lindsay *et al.*, 2002). De acuerdo con esto, evidencias recientes han mostrado que el nivel de actividad de regiones corticales heteromodales que presentan un elevado grado de conectividad funcional durante el estado de reposo cerebral en personas mayores sanas se asemeja más al nivel de actividad mostrado por pacientes con EA que al mostrado por personas jóvenes (Pasquini *et al.*, 2014). Este resultado no es de extrañar si consideramos que la patofisiología de la EA comienza a aparecer varias décadas antes de que aparezcan los primeros síntomas clínicos de la enfermedad (Braak *et al.*, 2011), por lo que es

muy posible que algunas de las personas mayores incluidas como controles en muchos estudios pudieran ya encontrarse incubando la EA.

La EA se caracteriza por la acumulación progresiva de fragmentos de beta amiloide ($A\beta$) insoluble en el líquido intersticial del cerebro, dando lugar a depósitos de $A\beta$ que producen disfunciones sinápticas en las neuronas piramidales de la neocorteza e hipocampo, estructuras cerebrales que juegan un papel relevante en funciones cognitivas superiores como la memoria, lenguaje y atención (Terry *et al.*, 1991; Masliah *et al.*, 1993). Las placas seniles son agregados del polipéptido $A\beta$ que se rodean de prolongaciones neuronales degeneradas (Figure 3A). Estos agregados proceden de la ruptura enzimática de una proteína de mayor tamaño denominada Proteína Precursora de Amiloide (*Amyloid Precursor Protein*, APP, siglas en inglés), necesaria para el crecimiento y supervivencia de la neurona. La acción de diferentes proteasas da lugar a diversas formas de $A\beta$, siendo la forma $A\beta_{1-40}$ la más predominante y menos perjudicial en comparación con las formas $A\beta_{1-42}$ o $A\beta_{1-43}$ que son menos solubles y más neurotóxicas (Haass & Selkoe, 2007).

Evidencias recientes avalan la hipótesis de que los mecanismos patológicos del $A\beta$ contribuyen al deterioro de la conectividad funcional desde los estadios más tempranos de la EA. Experimentos *in vitro* y con modelos animales *in vivo* han mostrado que los oligómeros solubles de $A\beta$ son más sinaptotóxicos que los propios depósitos de $A\beta$ y están relacionados con el daño sináptico que caracteriza a la EA (Cheng *et al.*, 2007; Walsh & Selkoe, 2007; Selkoe, 2008; Zahs & Ashe, 2013). Así, el $A\beta$ soluble altera el funcionamiento de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR5) lo que conduce irremediablemente a un deterioro de los mecanismos de potenciación a largo plazo y de plasticidad sináptica (Marcello *et al.*, 2012; Sivanesan *et al.*, 2013). Por otra parte, las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza han mostrado estar especialmente afectadas por la presencia de placas de $A\beta$ (Arnold *et al.*, 1991), lo que podría afectar a los procesos de sincronización oscilatoria entre regiones corticales (Lopes da Silva & Van Rotterdam, 1993). De hecho, la mayor parte de la degeneración sináptica afecta a las neuronas piramidales de estas capas corticales y también a

sus proyecciones cortico-corticales (Rogers & Morrison, 1985; Hof *et al.*, 1990; Terry *et al.*, 1991).

Otro rasgo neuropatológico de la EA es la presencia de ovillos neurofibrilares formados por un conglomerado anormal de proteína tau (Figura 3B). En condiciones normales, la fosforilación de la proteína tau regula el ensamblaje y la estabilización de los microtúbulos que forman el citoesqueleto de la neurona, promueve el crecimiento neuronal, y facilita el soporte enzimático y el transporte axonal de las organelas hasta las terminaciones nerviosas (Wang & Liu, 2008). Sin embargo, en la EA, la proteína tau está hiperfosforilada, por lo que pierde su capacidad para ensamblar microtúbulos, y termina agregándose en el interior de la célula (Iqbal *et al.*, 2009), afectando a la capacidad funcional de las neuronas que acaban muriendo (Morishima-Kawashima & Ihara, 2002).

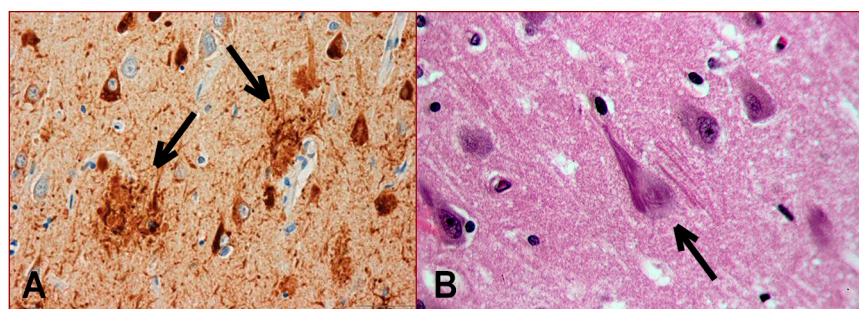


Figura 3. Neuropatología de la EA. **A.** Agregados de A β rodeados por prolongaciones neuronales anormales. **B.** Ovillos neurofibrilares formados por filamentos heliocoidales de proteína tau. Ambos fenómenos están señalados por flechas negras.

De forma general, el síndrome de DCL se considera como un estado intermedio entre el envejecimiento normal y la EA (Petersen *et al.*, 1999) y, por tanto, los individuos con DCL presentan un mayor riesgo de desarrollar demencia que las personas mayores sanas (Busse *et al.*, 2006). Sin embargo, aquellos estudios que evalúan las tasas de conversión a EA también muestran que algunos sujetos con DCL permanecen estables a lo largo del tiempo, pudiendo incluso revertir su estado cognitivo (Ganguli *et al.*, 2011). Varios estudios han estimado la

progresión de DCL a EA, aunque los resultados varían en función de factores como la heterogeneidad de la muestra, la utilización de diferentes criterios para diagnosticar el DCL y/o los diferentes tiempos de seguimiento empleados (Geslani *et al.*, 2005). Por ejemplo, Busse y colaboradores estimaron una tasa de conversión anual para los DCL entre el 6 y 25% (Busse *et al.*, 2003) en comparación con el 1-2% que mostraron las personas mayores sanas (Petersen *et al.*, 2001; Farias *et al.*, 2009). En un estudio de 6 años de seguimiento realizado a 1045 personas mayores se observó que entre el 65% de las personas diagnosticadas con DCL desarrollaban una demencia en los primeros 18 meses de estudio (Busse *et al.*, 2006). Otros estudios longitudinales realizados con DCL han establecido un 13,7% de conversión a demencia durante el primer año, que llega a extenderse hasta un 34,7% durante el tercer año. Del total de las conversiones, el 78,3% desarrollaron EA (Allegri *et al.*, 2010). En el caso de los sujetos con DCLa, diversos estudios han mostrado una elevada tasa de conversión a EA, que oscila entre el 38% por año (Maioli *et al.*, 2007), 44% a los dos años (Schmidtke & Hermeneit, 2008) y 49% a los 2,5 años (Fisher *et al.*, 2007).

El genotipo ApoE ϵ 4 es el factor de riesgo genético más relevante en la EA (Corder *et al.*, 1993), aunque otros genes también parecen jugar un papel en esta patología neurodegenerativa (Lambert *et al.*, 2009; Harold *et al.*, 2009; Seshadri *et al.*, 2010; Hollingworth *et al.*, 2011), sobre todo aquellos que participan en la regulación del metabolismo de lípidos (Wollmer, 2010). El gen ApoE se encuentra ubicado en el cromosoma 19 y presenta tres isoformas diferentes: ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3 y ApoE ϵ 4. Estudios recientes muestran que la isoforma ApoE ϵ 4 está presente en el 50% de los pacientes con EA en comparación con el 20-25% de los individuos sanos (Verghese *et al.*, 2011), y su presencia podría explicar un 20% del riesgo de desarrollar esta enfermedad (Lambert & Amouyel, 2011). Dicha probabilidad podría alcanzar el 62% en sujetos con DCL (Aggarwal *et al.*, 2005). Además, la presencia del genotipo ApoE ϵ 4 también se considera un excelente predictor del deterioro cognitivo en personas mayores cognitivamente intactas (Boyle *et al.*, 2010). Por lo tanto, ser portador del genotipo ApoE ϵ 4 es un factor de riesgo genético tanto para desarrollar EA (Rogaeva *et al.*, 2006; Kim *et*

al., 2009) como DCLa (Tervo *et al.*, 2004), aunque ciertamente no todas las personas portadoras de este genotipo desarrollarán EA.

Independientemente de la presencia del alelo $\epsilon 4$, diferentes estudios han mostrado que las personas mayores con DCL presentan un mayor daño cerebral que los CN. Estudios *post mortem* han revelado que los sujetos con DCL presentan un 18% menos de sinapsis en la capa CA1 del hipocampo que las personas mayores cognitivamente intactas, que además correlaciona con el deterioro de la memoria en los sujetos con DCL (Scheff *et al.*, 2007). En otro trabajo se observó que la disminución de la densidad sináptica se redujo al 13% en la capa molecular del giro dentado en individuos con DCL (Scheff *et al.*, 2006). Estas alteraciones sinápticas se extendieron por la corteza temporal superior, donde se observó una reducción significativa de los niveles de debrina, una proteína utilizada como marcador de plasticidad sináptica de las espinas dendríticas. Paradójicamente, los niveles de debrina incrementaron un 30% en la corteza frontal en la misma población de sujetos, lo que podría estar reflejando un mecanismo compensatorio o la desigual vulnerabilidad de diferentes regiones corticales ante las lesiones neuronales que preceden al diagnóstico clínico de la EA (Counts *et al.*, 2006).

Por otra parte, diferentes estudios han observado que las personas con DCL presentan una mayor cantidad de ovillos neurofibrilares que los CN (Price & Morris, 1999; Guillozet *et al.*, 2003; Sabbagh *et al.*, 2006; Markesbery *et al.*, 2006), confirmándose este hallazgo en la corteza entorrinal, hipocampo, lóbulo parietal inferior (Markesbery, 2010) y giro parahipocampal (Markesbery *et al.*, 2006).

Estudios realizados con RM estructural han corroborado gran parte de los hallazgos obtenidos con estudios *post mortem* en personas mayores con DCL. En general, los individuos con DCL presentan mas atrofas que los CN en estructuras del lóbulo temporal medial, sobre todo en el hipocampo (Wang *et al.*, 2009; Mueller *et al.*, 2010) y en la corteza entorrinal (Stoub *et al.*, 2010). Estas atrofas no solo correlacionan con el deterioro de la memoria que caracteriza al DCL (*e.g.*, Atienza *et al.*, 2011) sino que también poseen un importante valor predictivo para la conversión a EA (Tapiola *et al.*, 2008; Stoub *et al.*, 2010). Según algunos estudios, la reducción

de volumen de la corteza entorrinal permite una mejor diferenciación entre personas mayores con y sin DCL (De Toledo-Morrel *et al.*, 2000; Pennanen *et al.*, 2004).

Las lesiones cerebrales que presentan los sujetos con DCL presentan una distribución topográfica muy definida que correlaciona con la naturaleza de sus síntomas: daños en el hipocampo, corteza entorrinal y corteza cingulada posterior (que explican la afectación de la memoria episódica), y daños de la corteza temporal lateral (que explican los problemas de lenguaje, afectación de la memoria semántica y deterioro de la función visuoespacial). Este escenario neuropatológico se acompaña de alteraciones de la conectividad funcional entre estas áreas de la corteza cerebral, y su efecto se va extendiendo a regiones próximas a medida que avanza la enfermedad (Pievani *et al.*, 2011). Esta hipótesis encuentra soporte experimental en una serie de estudios que muestran que los circuitos funcionales entre regiones cerebrales distantes se encuentran alterados en personas con DCLa, afectando de forma muy evidente a las cortezas parietales y temporales (Sorg *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2010; Cha *et al.*, 2013), mientras que la conectividad funcional de regiones frontales, parietales y el tálamo se deteriora progresivamente a medida que avanza la enfermedad (Bai *et al.*, 2011). Es posible que las disfunciones sinápticas causadas por los elevados niveles de A β en el espacio intersticial del cerebro (Palop & Mucke, 2010; Mormino *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013) contribuyan a esta descoordinación funcional entre regiones cerebrales distantes desde estadios muy tempranos de la EA.

Por otra parte, las disfunciones sinápticas que caracterizan al DCL presentan correlatos cerebrales que correlacionan con el deterioro cognitivo. Por ejemplo, el hipometabolismo de la corteza parietal que presentan los sujetos con DCL está relacionado con los patrones anormales de actividad cerebral en tareas de codificación de memoria (Sperling *et al.*, 2009). Además, se ha observado que los niveles elevados de A β conducen a una hiperexcitabilidad neuronal y a respuestas compensatorias de otras regiones cerebrales (Mormino *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Podría además suceder que la concentración de A β cerebral afectase de forma diferencial a las sinapsis excitadoras e inhibitoras, lo que produciría un efecto

inesperado y complejo sobre una amplia variedad de circuitos neurales. Así, experimentos realizados con personas mayores con DCL han mostrado niveles de activación paradójicos en las regiones de la red por defecto (Gusnard *et al.*, 2001; Raichle *et al.*, 2001; Buckner *et al.*, 2005; Sperling *et al.*, 2010; Mevel *et al.*, 2011), resultados que coinciden con estudios animales que muestran que los niveles elevados de A β cerebral aceleran la citotoxicidad y conducen a una hiperexcitabilidad neuronal (Palop & Mucke, 2010; Mormino *et al.*, 2011).

El ritmo alfa (7,5-12,5 Hz) es el correlato neuroeléctrico del estado de vigilia relajada con ojos cerrados en humanos, aunque estas oscilaciones también están presentes en otras especies de mamíferos (Cantero *et al.*, 2002). Las oscilaciones alfa son generadas de forma intrínseca por neuronas piramidales de la capa V de la corteza (Silva *et al.*, 1991), neuronas especialmente propensas a concentrar agregados de A β en pacientes con EA (Arnold *et al.*, 1991). El tálamo, otra fuente generadora de oscilaciones alfa, a través de las neuronas tálamo-corticales (Lopes da Silva, 1991; Hughes *et al.*, 2004), también presenta una cantidad modesta de agregados de A β y ovillos neurofibrilares en pacientes con EA (Rudelli *et al.*, 1984; Masliah *et al.*, 1989; Braak & Braak, 1991). Los patrones de conectividad funcional EEG durante el estado de reposo cerebral, caracterizado por la presencia del ritmo alfa, han mostrado estar sensiblemente afectados en personas mayores con DCLa (Babiloni *et al.*, 2006a; Cantero *et al.*, 2009). Sin embargo, no se tienen evidencias de que el deterioro de estos patrones de conectividad funcional esté asociado con cambios en la integridad anatómica o metabólica cerebral, o específicamente de las regiones que participan en la generación del ritmo alfa. Tampoco se tiene conocimiento de si la disminución de conectividad funcional EEG asociada al estado de reposo cerebral en los sujetos con DCLa está relacionada con cambios en los niveles de A β en sangre o con otros marcadores que facilitan la amiloidogénesis, como por ejemplo los niveles de lípidos (Pappolla *et al.*, 2003; Shobab *et al.*, 2005; Panza *et al.*, 2006; Ghribi, 2008; Martins *et al.*, 2009; Di Paolo & Kim, 2011). Estas son algunas de las lagunas de conocimiento que se pretenden cubrir con el presente trabajo de Tesis Doctoral.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivos

El objetivo central del presente trabajo ha sido establecer los correlatos neuroanatómicos (RM) y neurometabólicos (PET-FDG) del deterioro de la conectividad funcional EEG que caracteriza al estado de reposo cerebral en personas mayores con DCLa, al mismo tiempo que determinar sus diferencias respecto al envejecimiento normal. Por otra parte, se ha evaluado si los patrones de conectividad funcional EEG asociados a cada trayectoria de envejecimiento muestran alguna relación con posibles marcadores de la EA identificados en sangre periférica. Finalmente, se ha estudiado si alguno de los marcadores arriba mencionados permite discriminar entre los individuos con DCLa portadores y no portadores del alelo $\epsilon 4$ en el gen ApoE y entre los DCLa que convierten a EA (cDCLa) y los que no lo hacen (ncDCLa) transcurridos dos años desde el reclutamiento. Para alcanzar estos objetivos, se han realizado registros de EEG basal (vigilia relajada con ojos cerrados), se han adquirido imágenes de RM y PET cerebral con el radiofármaco FDG, y se han determinado en sangre periférica las concentraciones de A β y de diferentes marcadores de lípidos en un grupo de personas mayores sanas (CN) y otro con DCLa. Los mismos marcadores fueron evaluados dos años más tarde en el el grupo con DCLa.

De este objetivo general emanan los siguientes objetivos específicos:

- i) Evaluar si los patrones de conectividad funcional EEG difieren entre CN y DCLa. Dada la predisposición genética de los portadores del genotipo ApoE $\epsilon 4$ para desarrollar EA con mayor frecuencia, también se estudiará si existen diferencias en los patrones de conectividad funcional EEG entre individuos DCLa portadores ($\epsilon 4^+$) y no portadores ($\epsilon 4^-$) de este genotipo.
- ii) Estudiar si el deterioro de la conectividad funcional EEG muestra alguna relación con los cambios de volumen (SG cortical, SB cerebral, SG de los generadores del ritmo alfa)

y/o de consumo de glucosa (cortical y de los generadores del ritmo alfa) en CN y DCLa, separadamente. Los mismos análisis se han realizado para los grupos DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$.

- iii) Estudiar si los niveles de A β y de lípidos en sangre guardan alguna relación con los patrones de conectividad funcional EEG en CN y DCLa, separadamente. Los mismos análisis se han realizado para los grupos DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$.
- iv) Estudiar si los niveles de A β y de lípidos en sangre muestran alguna relación con los cambios de volumen (SG cortical, SB cerebral, SG de los generadores del ritmo alfa) y/o de consumo de glucosa (cortical y de los generadores del ritmo alfa) en CN y DCLa, separadamente. Los mismos análisis se han realizado para los grupos DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$.
- v) Evaluar si alguno de los marcadores empleados en el presente trabajo (pruebas cognitivas, niveles de A β y de lípidos en sangre, conectividad funcional EEG, cambios anatómicos y metabólicos cerebrales) son capaces de discriminar entre los DCLa que convirtieron a EA (cDCLa) y aquellos que no lo hicieron (ncDCLa) transcurridos dos años desde el reclutamiento.

3.2. Hipótesis

3.2.1. Hipótesis I

Las oscilaciones EEG son el resultado de la suma de los potenciales postsinápticos excitadores e inhibidores generados por las neuronas piramidales de la corteza cerebral (Lopes da Silva & Van Rotterdam, 1993), que son las más afectadas por la presencia de agregados de A β desde las fases más tempranas de la EA (Terry *et al.*, 1981; Rogers & Morrison, 1985; Hof *et al.*, 1990; Arnold *et al.*, 1991). El ritmo alfa (7,5-12,5 Hz) humano, en particular, está

generado de forma intrínseca por neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza occipital (Silva *et al.*, 1991; Lopes da Silva *et al.*, 1991), por el precúneo, estructura que muestra una elevada carga de A β en personas con DCLa (Driscoll *et al.*, 2012), y por el tálamo, región subcortical que presenta una cantidad modesta de agregados de A β y ovillos neurofibrilares en pacientes con EA (Rudelli *et al.*, 1984; Masliah *et al.*, 1989; Braak & Braak, 1991). Además, el ritmo alfa se extiende por diferentes regiones corticales gracias a las conexiones cortico-corticales de las neuronas piramidales que forman los haces de fibras longitudinales (Cantero *et al.*, 2000). El hecho que la patología de la EA afecte a este sistema de conexiones anatómicas debería tener consecuencias no solo sobre la generación de este ritmo cerebral sino también sobre su propagación por la corteza. Partimos por tanto de la hipótesis que los patrones de conectividad funcional EEG durante el estado de reposo cerebral, concretamente a través de las oscilaciones alfa, deberían estar significativamente más afectados en sujetos con DCLa que en CN. Dado que los generadores corticales de estas oscilaciones se localizan en regiones posteriores, los patrones de conectividad funcional de la parte posterior de la corteza deberían verse especialmente afectados. Por otra parte, los pacientes con EA que presentan el genotipo ApoE ϵ 4 muestran una reducción más acentuada de los niveles de colina-acetiltransferasa (ChAT) en la corteza frontal que los pacientes con EA que no presentan este genotipo (Soininen *et al.*, 1995). Por lo que es muy posible que los sujetos DCLa ϵ 4⁺ muestren reducciones significativas de los niveles de conectividad funcional EEG que afecten fundamentalmente a estructuras del lóbulo frontal, respecto a los DCLa ϵ 4⁻.

3.2.2. Hipótesis II

Diversos estudios apuntan a que los patrones de conectividad funcional que caracterizan al estado de reposo cerebral están determinados por la integridad anatómica de las estructuras cerebrales que los sustentan (Koch *et al.*, 2002; Greicius *et al.*, 2009; Honey *et al.*, 2009; van den Heuvel *et al.*, 2009), aspecto que se deteriora durante el envejecimiento (para una revisión, ver Damoiseaux *et al.*, 2009). Por ejemplo, durante el envejecimiento se produce una

disminución de la integridad de los haces de fibras córtico-subcorticales que conectan a las regiones responsables de los circuitos funcionales del estado de reposo cerebral, que correlaciona con el deterioro de la función ejecutiva y una menor velocidad de procesamiento (Ystad *et al.*, 2010). La relación estructura-función se ve igualmente afectada en pacientes con EA, tal como apunta la relación entre el grado de atrofia del cuerpo calloso y la disminución de la coherencia inter-hemisférica del EEG durante el estado de reposo cerebral (Pogarell *et al.*, 2005). Hasta la fecha, no existen evidencias que sugieran una relación entre el deterioro de la conectividad funcional EEG y cambios anatómicos cerebrales en personas mayores con y sin DCLa. En este trabajo partimos de la hipótesis de que los patrones de conectividad funcional EEG mostrarán una relación anatómica diferencial dependiendo de cada trayectoria de envejecimiento (CN o DCLa), estableciendo una relación más evidente con estructuras temporo-parietales en el caso de los DCLa, por ser estas regiones las más afectadas durante las fases más tempranas de la EA.

3.2.3. Hipótesis III

Aunque se desconoce cuál es el mecanismo que origina la cascada amiloide, se tienen sobradas evidencias de que la presencia de este fenómeno ocurre desde fases muy incipientes de la EA (Morris & Price, 2001; Markesbery *et al.*, 2006). Si bien la concentración del péptido $A\beta_{1-42}$ se determina normalmente en líquido cerebro-espinal (LCE), diferentes estudios transversales han mostrado que las personas mayores con DCLa muestran a nivel basal concentraciones de $A\beta$ en plasma más elevadas que los CN (Sobów *et al.*, 2005; Storace *et al.*, 2010; Pesini *et al.*, 2012). En base a estos hallazgos y considerando que las regiones cerebrales generadoras del ritmo alfa muestran agregados de $A\beta$ desde fases tempranas de la EA, nuestra hipótesis establece que los niveles plasmáticos de $A\beta$ mostrados por CN y DCLa se relacionen de diferente forma con los patrones de conectividad funcional EEG.

3.2.4. Hipótesis IV

Finalmente, estudios previos han proporcionado soporte experimental a la relación entre una regulación anormal de la homeostasis del colesterol y la amiloidogénesis (Bodovitz & Klein, 1996; Simons *et al.*, 1998; Refolo *et al.*, 2000; Grösgen *et al.*, 2010). Sin embargo, y hasta nuestro conocimiento, no existen experimentos que hayan evaluado las relaciones entre los niveles de lípidos en sangre y los patrones de conectividad funcional EEG en personas mayores con y sin DCLa. Nuestra hipótesis establece que el incremento de los niveles de lípidos en sangre podría estar relacionados con el deterioro de la conectividad funcional EEG en el grupo con DCLa, o en su defecto, con la integridad anátomo-funcional de las estructuras cerebrales que participan en la generación del ritmo alfa, dada la mayor presencia de agregados de A β en los sujetos con DCLa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sujetos

En el presente estudio participaron 26 personas mayores neurológicamente normales y sin alteraciones cognitivas objetivables (CN) y 29 personas mayores con deterioro cognitivo leve de tipo amnésico (DCLa). La muestra experimental fue reclutada en el Laboratorio de Neurociencia Funcional (Universidad Pablo de Olavide, Sevilla) y en la Unidad de Demencias del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. La participación en el estudio fue completamente voluntaria, existiendo la posibilidad de abandonar los experimentos si el participante o sus familiares lo consideraban oportuno. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado antes de comenzar el estudio. Los protocolos experimentales empleados en este trabajo fueron previamente aprobados por el Comité Ético de Investigación con Humanos de la Universidad Pablo de Olavide, y por el Comité de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Todos los procedimientos empleados han respetado los principios de la Declaración de Helsinki (1975, revisados en 2000).

El diagnóstico de DCLa se basó en criterios internacionales de consenso (Petersen *et al.*, 1999):

- i) Quejas subjetivas de memoria corroboradas por el acompañante.
 - ii) Deterioro objetivo de la memoria confirmado mediante pruebas neuropsicológicas.
- Para evaluar este aspecto se utilizó la versión española de los subtests de Memoria Lógica contenidos en la Escala de Memoria de Wechsler, 3ª Edición. El subtest de Memoria Lógica para el *recuerdo inmediato* está formado por dos historias que se leen al participante y que éste debe recordar inmediatamente después de dicha lectura. El subtest de Memoria Lógica para el *recuerdo demorado* consiste en recordar las mismas historias tras un intervalo de 30 minutos. Se emplearon puntuaciones de corte de 1,5 desviaciones estándar inferiores a la media de la edad del sujeto. Además, se

utilizó la siguiente batería de pruebas neuropsicológicas para descartar la afectación de otros dominios cognitivos diferentes a la memoria: Test de Denominación de Boston (validación española, Peña-Casanova *et al.*, 2009a), Trail Making Test (validación española, Peña-Casanova *et al.*, 2009b), Test de la Figura Compleja de Rey-Osterrieth (validación española, Peña-Casanova *et al.*, 2009c), y la Batería de Percepción Espacial y Visual de Objetos (validación española, Peña-Casanova *et al.*, 2009d).

- iii) Actividades de la vida diaria conservadas, evaluadas mediante la Escala para el Deterioro de las Actividades de la Vida Diaria (validación española, Böhm *et al.*, 1998).
- iv) No reunir criterios diagnósticos de EA (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 4ª versión; DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994).
- v) Puntuación global de 0,5 (demencia cuestionable) en la Escala de Demencia Clínica (*Clinical Dementia Rating*, CDR, siglas en inglés) (Hughes *et al.*, 1982).

Los sujetos diagnosticados con DCLa fueron revisados dos años más tarde por el mismo neurólogo y neuropsicóloga, empleando la misma batería de pruebas cognitivas utilizada durante el reclutamiento. Esto permitió estudiar la evolución de cada caso, y agruparlos en aquellos que convirtieron a EA (cDCLa) y aquellos que permanecían estables (ncDCLa). Ninguno de los DCLa cumplió los criterios de sujeto CN transcurridos dos años.

El diagnóstico de EA se realizó en base a los criterios diagnósticos recogidos en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 4ª versión (DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994):

- i) Alteración de la capacidad para adquirir y recuperar nuevas memorias.
- ii) Presencia de una o más de las siguientes alteraciones: afasia, apraxia, agnosia y/o deterioro de la función ejecutiva.

- iii) Las alteraciones (i y ii) interfieren de forma significativa con la actividad social y/o laboral del paciente, además de mostrar una evolución gradual y un deterioro cognitivo progresivo.
- iv) Las alteraciones (i y ii) no se asocian con un síndrome confusional agudo.
- v) El cuadro clínico no es atribuible a una alteración psiquiátrica (e.g., depresión mayor o esquizofrenia).
- vi) Además de los criterios anteriores, el paciente debe mostrar una puntuación global de 1 (demencia leve) en la Escala de Demencia Clínica (Hughes *et al.*, 1982).

Los criterios de inclusión para los sujetos del grupo control (CN) fueron:

- i) Ausencia de un deterioro objetivo de la memoria, evaluado mediante las mismas pruebas neuropsicológicas utilizadas en los sujetos con DCLa.
- ii) Actividades de la vida diaria conservadas, evaluadas con la misma escala que se utilizó en los sujetos con DCLa.
- iii) Puntuación global de 0 (ausencia de demencia) en la Escala de Demencia Clínica (Hughes *et al.*, 1982).

Además, se administró el Mini Examen Cognoscitivo (*Mini-Mental State Examination*, MMSE, siglas en inglés) (validación española, Lobo *et al.*, 1979) a cada participante con el objetivo de valorar la función cognitiva global. La presencia de sintomatología depresiva fue excluida mediante la administración de la versión abreviada de la Escala de Depresión Geriátrica (empleándose como criterio de exclusión puntuaciones iguales o mayores a 5; Yesavage *et al.*, 1983).

A todos los participantes del estudio se les realizó una exploración neurológica detallada por el mismo neurólogo, con el objetivo de descartar enfermedades que pudieran afectar a la estructura y/o función cerebral. Paralelamente, se adquirieron imágenes cerebrales de RM (secuencias ponderadas en T1, T2 y FLAIR) para descartar lesiones anatómicas (infartos

cerebrales extensos, tumor cerebral, esclerosis del hipocampo y/o malformaciones vasculares). Aquellos individuos que presentaron isquemias relevantes de la SB periventricular y/o profunda (puntuaciones ≥ 2 en la Escala de Cambios en la Sustancia Blanca Relacionados con la Edad; Fazekas *et al.*, 1987) no fueron incluidos en el estudio. Se descartaron igualmente causas secundarias de deterioro cognitivo mediante pruebas de laboratorio (hemograma, vitamina B12/folato y función tiroidea). La presencia (o historial clínico previo) de enfermedades neurológicas (infarto cerebral, epilepsia, traumatismo cráneo-encefálico), psiquiátricas (depresión, psicosis, historia de consumo crónico de alcohol y/o otras sustancias que afecten al sistema nervioso) o de otra índole (cardiovascular, renal, hepática, pulmonar y/o endocrina), así como el uso de medicación que afectara a la función cognitiva (inhibidores de la colinesterasa, hipnóticos, antidepresivos, etc.) fueron también consideradas causas de exclusión.

4.2. Genotipado del gen ApoE

Cada participante acudió en ayunas a la Unidad de Biomarcadores del Laboratorio de Neurociencia Funcional (Universidad Pablo de Olavide) para proceder a la extracción de sangre. El ADN se extrajo de estas muestras mediante el procedimiento de "salting-out" (Miller *et al.*, 1988). La concentración y pureza de cada muestra de ADN fue obtenida mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000[®], Thermo Fisher Scientific), y la integridad del ADN se determinó mediante electroforesis (Mupid-One[®]). El ADN resultante se almacenó en viales de 1,5 mL y se congeló a -80°C.

Los diferentes polimorfismos del gen ApoE se obtuvieron mediante PCR (Step-One Plus, Applied Biosystem) con sondas TaqMan[®] (Applied Biosystem) específicas para cada SNP de interés (rs429358: sonda TaqMan C_3084793_20; rs7412: sonda TaqMan C_904973_10). Todas las reacciones se amplificaron por duplicado siguiendo las instrucciones de cada ensayo TaqMan.

La presencia/ausencia del alelo $\epsilon 4$ en el gen ApoE no se empleó como criterio de inclusión en ninguno de los grupos. La influencia del alelo ApoE $\epsilon 4$ fue evaluada exclusivamente en el grupo con DCLa, dado que solo 4 CN mostraron este alelo en dicho gen.

4.3. Determinación de los niveles de A β en sangre

Para la determinación de los niveles de A β_{1-40} y A β_{1-42} en plasma se emplearon kits comerciales ELISA de la marca Wako (A β_{1-40} : referencia 292-62301; A β_{1-42} High-sensitive: referencia 296-64401). Las muestras fueron descongeladas a una temperatura de 4°C y, posteriormente, se montaron por duplicado colocando 50 μ l de plasma en cada pocillo. Se montó también una muestra control por duplicado en cada placa para controlar la variabilidad entre experimentos.

Se realizó una incubación de 17 horas a 4°C con el anticuerpo BA27 para A β_{1-40} y con el anticuerpo BC05 para A β_{1-42} . Finalmente, se midieron las absorbancias a 450 nm con un lector de placas (Victor 3[®], Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts) y se obtuvieron las concentraciones (pg/ml) de A β_{1-40} y A β_{1-42} para cada sujeto. Posteriormente, se calculó el ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} que ha mostrado ser de utilidad para identificar a personas mayores en alto riesgo de desarrollar EA (Graff-Radford *et al.*, 2007). Los límites de detección para estos ensayos ELISA fueron de 1,04 pg/ml para A β_{1-40} y de 0,54 pg/ml para A β_{1-42} . Los coeficientes de variación de los diferentes ensayos realizados se mantuvieron por debajo del 10%.

Los niveles de A β en plasma también se determinaron dos años más tarde en los sujetos con DCLa empleando el mismo protocolo aquí descrito.

4.4. Determinación de los niveles de lípidos en sangre

Para determinar las concentraciones de lípidos en muestras de sangre, se utilizó un analizador de acceso aleatorio y continuo (A15 Random Access Analyzer[®], BioSystems, Barcelona,

España) que realiza mediciones de absorción molecular basadas en espectrometría en muestras de origen biológico (e.g., suero, plasma, LCE, orina). Este analizador prepara las reacciones con la ayuda de un brazo manipulador cartesiano de tres ejes (X, Y, Z) que soporta y desplaza una punta dosificadora termostatizada para la dispensación de los reactivos y de las muestras. La dosificación se realiza mediante una bomba de pistón cerámico de bajo mantenimiento, y las reacciones tienen lugar en un rotor termostatizado a 37°C en el que directamente se realizan las lecturas de absorbancia mediante un sistema óptico integrado.

Todos los reactivos utilizados en el presente estudio, incluyendo controles de bioquímica y lipídicos, pertenecen a la línea de reactivos de BioSystems (<http://www.biosystems.es/>). Los marcadores de lípidos determinados en el presente estudio fueron colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoprotein*, LDL, siglas en inglés), lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoprotein*, HDL, siglas en inglés), triglicéridos y Apolipoproteína B (APOB).

Los niveles de lípidos en sangre también se determinaron dos años más tarde en los sujetos con DCLa empleando el mismo protocolo aquí descrito.

4.5. Adquisición y post-procesamiento de los registros de EEG

A todos los participantes del estudio (CN y DCLa) se les realizó un registro de EEG basal (vigilia relajada con ojos cerrados) durante aproximadamente 10 minutos, entre las 9:00 y las 10:00 de la mañana. Durante el tiempo de registro se controló el nivel de alerta para evitar los efectos de la somnolencia sobre el ritmo alfa (Santamaria & Chiappa, 1987). A los sujetos diagnosticados con DCLa se les volvió a registrar el EEG dos años más tarde, empleando el mismo protocolo de adquisición y análisis.

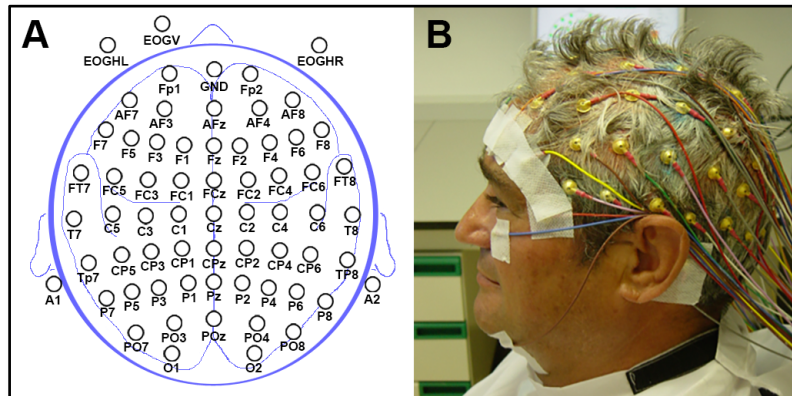


Figura 4. Montaje de electrodos EEG. **A.** Dibujo esquemático de la posición de los electrodos EEG. **B.** Foto de un sujeto con el montaje de electrodos EEG empleado en el presente estudio. EOGHL: electrodo de electrooculografía horizontal del ojo izquierdo; EOGHR: electrodo de electrooculografía horizontal del ojo derecho; EOGV: electrodo de electrooculografía vertical colocado debajo del ojo izquierdo (referenciado al electrodo Fp1).

El protocolo de registro incluyó 59 electrodos de EEG (Fp1, Fp2, AF7, AF3, AFz, AF4, AF8, F7, F5, F3, F1, Fz, F2, F4, F6, F8, FT7, FC5, FC3, FC1, FCz, FC2, FC4, FC6, FT8, T7, C5, C3, C1, Cz, C2, C4, C6, T8, TP7, CP5, CP3, CP1, CPz, CP2, CP4, CP6, TP8, P7, P5, P3, P1, Pz, P2, P4, P6, P8, PO7, PO3, POz, PO4, PO8, O1 y O2), 4 electrodos de electrooculografía (EOG) para registrar movimientos oculares horizontales y verticales, y 2 electrodos de electromiografía (EMG) colocados sobre los músculos submentonianos para registrar el tono muscular. Todos los electrodos se referenciaron al promedio de la actividad registrada en ambos mastoides (A1 y A2). La ubicación de los electrodos de EEG sobre el cuero cabelludo se realizó siguiendo las coordenadas de la versión extendida del Sistema Internacional 10-20 (Jasper, 1958) (Figura 4). Los registros se realizaron con electrodos de disco de 10 mm de diámetro chapados en oro y con una longitud de cable de 152 cm (Grass, Inc., referencia FS-E5GH-60). Previamente a la colocación de cada electrodo sobre la superficie del cuero cabelludo, se frotó la zona de interés con un bastoncillo empapado en crema abrasiva para eliminar las células muertas y la grasa de la piel. Posteriormente, se rellenó la copa de cada electrodo con una pasta electrolítica conductora (Ten20™, Weaver) para facilitar la conductancia eléctrica entre la piel y el electrodo. Los electrodos de EEG se fijaron al cuero cabelludo con colodión (solución al 4%,

Panreac, referencia 141278.0314), mientras que los electrodos de electrooculografía (EOG) y electromiografía (EMG) se adhirieron a la piel de la cara con cinta quirúrgica extra-adhesiva (Fixomull®, BSN medical GmbH). Para acelerar el proceso de fijación y secado del colodión, se aplicó aire comprimido a cada electrodo colocado sobre el cuero cabelludo. Se trató que los valores de impedancia de todos los electrodos se mantuvieran por debajo de 5 k Ω durante el transcurso de los registros. Las señales electrofisiológicas fueron amplificadas (BrainAmp MR, Brain Vision®), filtradas (filtro de paso de banda 0,1-100 Hz), digitalizadas (250 Hz, resolución 16-bits) y almacenadas para su análisis posterior.

Los registros de EEG fueron posteriormente transformados a una referencia promedio común para eliminar los efectos de la referencia original sobre la fase de las oscilaciones registradas (Schiff, 2005). En un siguiente paso, los registros fueron filtrados con un filtro de paso de banda de fase lineal para eliminar las distorsiones de fase cero. Los artefactos extracerebrales de origen ocular y/o muscular se eliminaron parcialmente mediante la técnica de análisis de componentes independientes (*Independent Component Analysis*, ICA, siglas en inglés; algoritmo Infomax), implementada en el programa BrainVision Analyzer v.1.05 (Brain Products® GmbH). Finalmente, los registros fueron inspeccionados manualmente para confirmar que los segmentos de EEG seleccionados para los análisis no mostraban artefactos evidentes. De esta selección de segmentos de EEG, se escogieron los primeros 60 s que contenían ritmo alfa.

A partir de estos 60 s de registro, se calculó la frecuencia dominante para cada sujeto, definida como el componente de frecuencia (Hz) que mostró la máxima potencia espectral en la banda alfa (7,5-12,5 Hz). Finalmente, estos registros de EEG fueron filtrados en el rango de la frecuencia dominante específica para cada sujeto \pm 0,5 Hz, empleando un filtro de respuesta finita de orden 1326 (frecuencia de atenuación = 0,5 Hz) con una ventana Kaiser.

4.6. Determinación de los patrones de conectividad funcional EEG

La Figura 5 muestra un diagrama ilustrativo con los principales pasos del análisis de conectividad funcional EEG, post-procesamiento y análisis estadístico de las imágenes de RM y PET-FDG cerebral.

A los registros EEG filtrados en la frecuencia dominante se les calculó las fases instantáneas mediante la transformada de Hilbert. Los patrones de conectividad funcional EEG entre todas las combinaciones de pares de electrodos fueron obtenidos con el índice de retraso de fase (*Phase Lag Index*, PLI, siglas en inglés, Stam *et al.*, 2007):

$$PLI = | \langle \text{sign}[\Delta\phi(tk)] \rangle |$$

donde $\Delta\phi(tk)$ representa la diferencia de fase entre las dos señales EEG en la misma muestra temporal (tk). La técnica del PLI determina la consistencia de fase entre pares de señales EEG, eliminando diferencias de fase 0 probablemente causadas por el volumen de conducción o por el efecto de una referencia activa (Stam *et al.*, 2007). Los valores de PLI oscilan entre 0 (ausencia total de acoplamiento de fase entre ambas señales EEG) y 1 (máximo acoplamiento de fase entre las dos señales EEG). En cada sujeto, los niveles de sincronización de fase entre cada par de electrodos resultaron de promediar los valores de PLI obtenidos en 7 segmentos de EEG consecutivos de 8 s de duración cada uno.

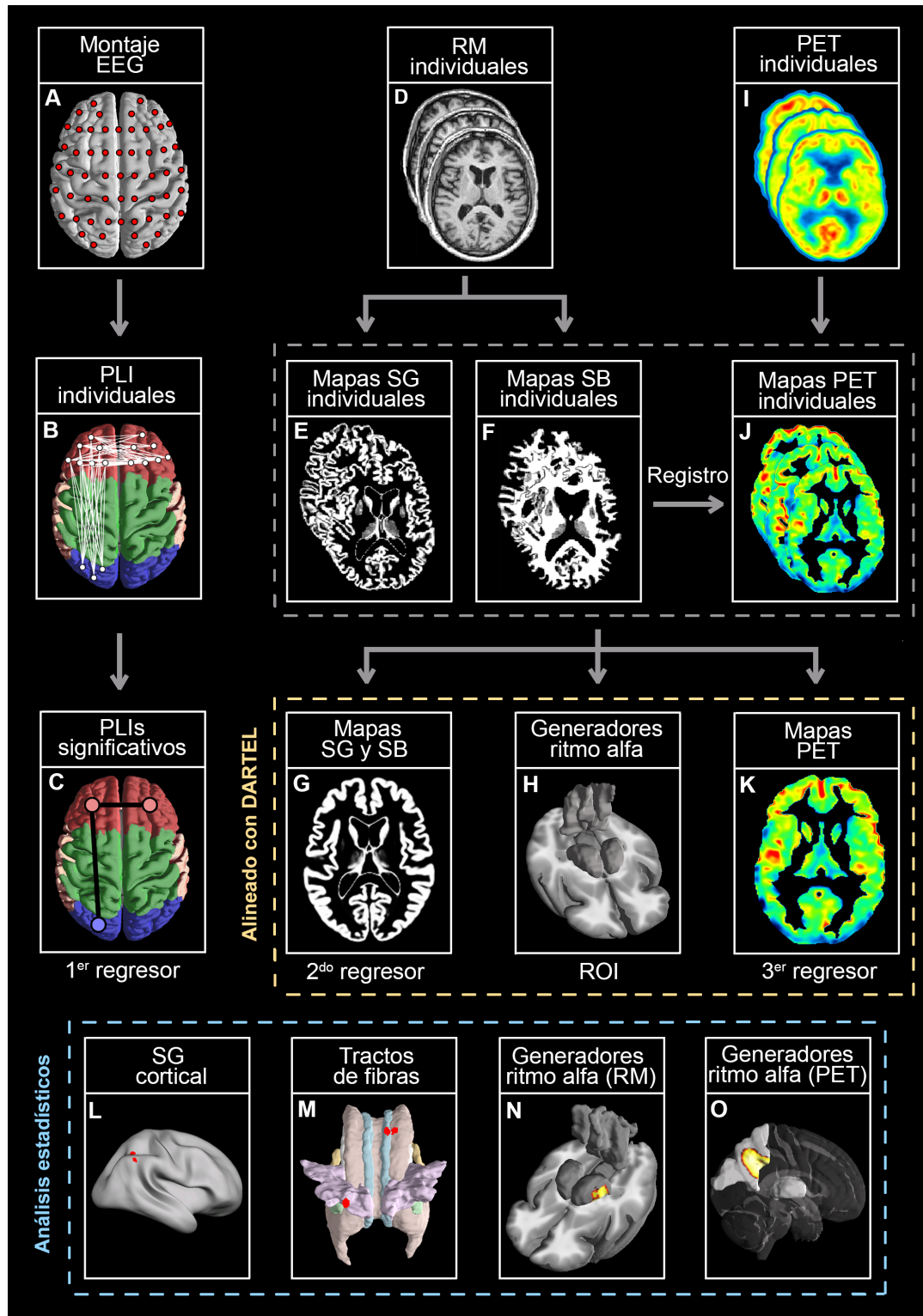


Figura 5. Diagrama ilustrativo de la metodología de análisis de la conectividad funcional EEG, post-procesamiento y análisis estadístico de las imágenes de RM y PET-FDG cerebral. **A.** Montaje EEG siguiendo las coordenadas de la versión extendida del Sistema Internacional 10-20 representado en Figura 4. **B.** Estimación de la conectividad funcional EEG en cada sujeto mediante la estimación del índice de retraso de fase (PLI). **D, I.** imágenes individuales de RM cerebral ponderadas en T1, y de PET-

FDG cerebral. **E, F y J.** Segmentación y normalización de las imágenes individuales de RM y PET (corregidas por volúmenes parciales). **C, G, H y K.** Estimación de los distintos regresores de conectividad funcional EEG, neuroanatómicos (volumen de SG cortical, SB cerebral, o de los generadores cerebrales del ritmo alfa) y neurometabólicos (consumo de glucosa cortical o de los generadores cerebrales del ritmo alfa). **L-O.** Análisis estadísticos de las diferencias de grupos y análisis de regresión a nivel de vóxel, empleando como regresores los valores de PLI, el volumen (RM) y el consumo de glucosa cerebral (PET-FDG). ROI: región de interés SB: sustancia blanca; SG: sustancia gris.

Con el objetivo de descartar que los valores de PLI obtenidos fueran debidos al azar, se introdujeron desfases temporales aleatorios en una de las dos señales de EEG empleadas para calcular el PLI, y se volvió a calcular este índice en cada sujeto (Lachaux *et al.*, 1999). En total se generaron 2.000 señales aleatorizadas para cada par de electrodos y sujeto, lo que resultó en una distribución de 2.000 valores de PLI. A continuación, los valores de estos 2.000 PLI se reordenaron en orden ascendente, de manera que el cuantil 95 sirvió como umbral de significación para establecer comparaciones entre ese PLI aleatorizado y su correspondiente PLI real mediante la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney (Pereda *et al.*, 2005). Las diferencias entre grupos solo se analizaron en aquellos PLI que superaron el umbral estadístico ($p < 0,05$) obtenido a partir de las señales aleatorias en al menos uno de los dos grupos (CN y/o DCLa; DCLa $\epsilon 4^+$ y/o DCLa $\epsilon 4^-$).

Con el objetivo de obtener patrones regionales de conectividad funcional intra- e inter-hemisférica, los electrodos EEG fueron agrupados en 4 regiones de interés (ROIs) en el hemisferio izquierdo (frontal: F7, F5, F3, F1, FC5, FC3, FC1; temporal: FT7, T7, TP7; parietal: Cp5, CP3, Cp1, P7, P5, P3, P1; y occipital: PO7, PO3, O1) y sus 4 ROIs homólogas en el hemisferio derecho. Los electrodos de la línea media (AFz, Fz, FCz, Cz, CPz, Pz, POz) y otros normalmente afectados por artefactos oculares y/o musculares fueron excluidos de los análisis. En total se calcularon 780 valores de PLI por cada participante: 380 intra-hemisféricos y 400 inter-hemisféricos.

4.7. Adquisición y post-procesamiento de las imágenes de RM cerebral

Se adquirieron dos imágenes estructurales de RM cerebral (secuencia T1-3D) en un escáner de cuerpo entero Philips Achieva 3T (Philips, The Netherlands), equipado con una bobina de 8 canales para cráneo. La secuencia T1-3D se definió a partir de los siguientes parámetros: tiempo de repetición = 2300 ms, tiempo de eco = 4,5 ms, ángulo de rotación = 8°, dimensiones de la matriz de adquisición = 256 x 192 x 1,2 mm de espesor (184 cortes contiguos), y tiempo de adquisición = 5,4 min. Antes de comenzar los experimentos, estos parámetros fueron optimizados empíricamente hasta lograr el mejor contraste de SG/SB. Las dos imágenes cerebrales de cada participante fueron corregidas para eliminar artefactos de movimiento y promediadas posteriormente con el objetivo de incrementar la razón señal/ruido.

A cada imagen de RM cerebral se le eliminó el cráneo y el tejido extracerebral sobrante, previamente a la realización de cualquier análisis cuantitativo. Esta labor se hizo, en primera instancia, mediante la aplicación de una aproximación híbrida que combina algoritmos *watershed* y superficies deformables (Segonne *et al.*, 2004), implementada en el programa Freesurfer v5.0 (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>). Los algoritmos *watershed* se basan en técnicas de morfología matemática que permiten determinar los límites de las regiones que integran una imagen compleja, al mismo tiempo que clasifican los vóxeles según su proximidad espacial, el gradiente de sus niveles de gris y la homogeneidad de sus texturas (Vincent & Soille, 1991). Las imperfecciones derivadas del proceso de segmentación automática realizado por Freesurfer fueron corregidas manualmente, corte a corte en los 3 planos del cerebro, por un técnico con experiencia en este procedimiento. Este protocolo de segmentación semi-automática ha mostrado mejorar sensiblemente el proceso de normalización espacial y la fiabilidad de los resultados obtenidos con técnicas de análisis de morfometría basada en vóxel (*Voxel-Based Morphometry*, VBM, siglas en inglés) (Acosta-Carbonero *et al.*, 2008).

Los mismos parámetros de adquisición y post-procesamiento de la imagen de RM cerebral fueron empleados dos años más tarde en los sujetos con DCLa, para determinar la evolución de los marcadores anatómicos y su relación con los patrones de conectividad funcional EEG.

4.8. Adquisición y post-procesamiento de las imágenes de PET-FDG cerebral

Las imágenes de PET-FDG cerebral se adquirieron en un escáner de cuerpo entero Siemens Biograph 16 HiREZ (Siemens Medical Systems, Germany), utilizando una resolución de 4,2 mm en los ejes sagital-coronal y de 4,5 mm en el eje axial. Los participantes guardaron ayuno durante al menos 8 horas previas a la adquisición del PET. A cada sujeto se le colocó una vía intravenosa para la inyección del radiofármaco FDG, utilizándose una dosis promedio de 370 MBq. Posteriormente, los participantes fueron trasladados a una habitación con iluminación tenue donde permanecieron con los ojos cerrados durante 30 minutos, con el objetivo de minimizar la estimulación externa durante la absorción del radiofármaco. Transcurrido este tiempo se procedió a la adquisición de la imagen de PET cerebral, que fue finalmente reconstruida con una resolución de vóxel de 2,6 x 2,6 x 2 mm.

La limitada resolución espacial de las imágenes de PET produce una contribución artefactual de la captación del radiofármaco FDG que afecta a diferentes tejidos cerebrales, denominada *efecto de volúmenes parciales* (Soret *et al.*, 2007). Con el objetivo de determinar qué proporción de la señal detectada está exclusivamente asociada a la SG cerebral, las imágenes de PET-FDG se sometieron a un procedimiento de corrección de volúmenes parciales mediante el siguiente algoritmo implementado en el programa PMOD v3.17 (<http://www.pmod.com>) (Giovacchini *et al.*, 2004):

$$C_{corteza} = (C - C_{sb} * S_{sb}) / S_{corteza}$$

donde $C_{corteza}$ muestra el consumo de FDG corregido para cada vóxel de la corteza cerebral, C representa el consumo de FDG sin corregir, C_{sb} se refiere a la actividad de SB cerebral estimada (asumiendo que esta es homogénea), S_{sb} corresponde a la máscara suavizada de SB, y $S_{corteza}$ hace referencia a la máscara suavizada de la corteza cerebral.

Las imágenes de PET-FDG corregidas por volúmenes parciales fueron posteriormente registradas a las imágenes de RM. Mediante el algoritmo de registro implementado en el

programa PMOD se aplicaron transformaciones rígidas (rotaciones y translaciones) para maximizar la información compartida por las imágenes de RM y de PET, obteniéndose así una localización anatómica más precisa del consumo de glucosa cerebral. Finalmente, los valores absolutos de FDG de cada participante fueron normalizados a la corteza del cerebelo, transformados al espacio anatómico del MNI152, y suavizados con un kernel gaussiano isotrópico de 16 mm.

Los mismos parámetros de adquisición y post-procesamiento de la imagen de PET-FDG fueron empleados dos años más tarde con los sujetos con DCLa, para determinar la evolución de los marcadores de FDG y su relación con los patrones de conectividad funcional EEG.

4.9. Delimitación anatómica de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa

Estudios previos han mostrado que las principales fuentes neuroeléctricas que participan en la generación del ritmo alfa humano se localizan en el cúneo (corteza visual primaria), precúneo (corteza parietal superior medial) y tálamo (Cantero *et al.*, 2009). Con el objetivo de determinar si los patrones de conectividad funcional EEG registrados durante el estado de reposo cerebral están relacionados con cambios anatómicos y de consumo de glucosa en los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa en CN y DCLa, se delimitaron anatómicamente las fuentes generadoras del ritmo alfa para realizar las correlaciones entre el volumen/FDG cerebral y los valores de PLI que mostraron diferencias significativas al comparar los distintos grupos (CN vs. DCLa; DCLa $\epsilon 4^+$ vs. DCLa $\epsilon 4^-$).

Las estructuras cerebrales que participan en la generación del ritmo alfa (cúneo, precúneo y tálamo) se obtuvieron en el espacio anatómico de cada participante, a partir de la segmentación realizada por Freesurfer v5.0. A continuación, estas estructuras cerebrales se transformaron al espacio anatómico del atlas MNI empleando los parámetros de normalización obtenidos durante el post-procesamiento de las imágenes de RM de cada participante. Finalmente, las máscaras obtenidas fueron integradas en una única máscara binaria.

4.10. Análisis de morfometría basada en vóxel (VBM)

Las imágenes de RM cerebral fueron procesadas con el programa *Statistical Parametric Mapping* (SPM8; www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm) mediante la herramienta VBM8 (<http://dbm.neuro.uni-jena.de/vbm/download>).

Primeramente, se localizó el origen estereotáxico de cada imagen en la comisura anterior. A continuación, se normalizaron las intensidades y se alinearon todas las imágenes cerebrales al espacio anatómico MNI mediante una transformación afín no lineal de 12 parámetros, utilizando la plantilla avgT1_Dartel_IXI550_MNI152 (Collins *et al.*, 1994). Luego, se segmentaron los diferentes compartimentos del cerebro (LCE, SG y SB), utilizando mapas probabilísticos de cada compartimento corregidos por volúmenes parciales (Ashburner & Friston, 2005). Finalmente, se obtuvieron mapas de SG y SB con un tamaño de vóxel isotrópico de 1 mm³ para cada sujeto en el espacio del atlas MNI152.

Con el objetivo de minimizar las variaciones anatómicas entre los diferentes sujetos sin deformar excesivamente las imágenes cerebrales individuales, las imágenes de RM resultantes fueron registradas al sujeto promedio mediante la aplicación del algoritmo DARTEL (*Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie Algebra*) multidimensional (Ashburner, 2007), que emplea la plantilla avgT1_Dartel_IXI550_MNI152 integrada en la herramienta VBM8. El algoritmo DARTEL multidimensional permite realizar comparaciones estadísticas entre grupos teniendo en cuenta la variabilidad anatómica existente en cada vóxel previamente al proceso de normalización. El registro con DARTEL crea, a partir de los compartimentos segmentados en el espacio MNI, campos de deformación ("flow fields") de cada imagen cerebral individual que contienen la información de la transformación aplicada. Estos campos se obtienen a partir del sujeto promedio teniendo en cuenta las peculiaridades morfológicas de cada sujeto. De esta forma, el resultado de la deformación se considera óptimo porque preserva al máximo la morfología cerebral de cada individuo, en términos de SG y SB. Las imágenes fueron posteriormente moduladas para compensar los cambios de volumen que pudiesen deberse al registro afín (DARTEL), de manera que el volumen total de SG/SB antes

del registro fue preservado en las imágenes, al mismo tiempo que se conservaron las diferencias individuales del tamaño del cerebro en cada vóxel. Finalmente, las imágenes normalizadas de SG/SB fueron suavizadas con kernels gaussianos isotrópicos de 16 mm. Un ejemplo del proceso de segmentación y normalización de las imágenes se muestra en la Figura 5 (paneles E, F y G).

Los cambios de significativos de SG fueron localizados en sus áreas de Brodmann (BA) correspondientes transformando las coordenadas de los vóxeles más significativos del MNI152 al atlas del Talairach (Talairach & Tournoux, 1988) mediante una transformación no lineal (<http://imaging.mrc-cbu.cam.ac.uk/imaging/MniTalairach>). Para extraer las máscaras de SB cerebral, se emplearon mapas de máxima probabilidad de los principales tractos de SB integrados en la herramienta Fiber Tracts (http://www.fz-juelich.de/SharedDocs/Downloads/INM/INM-1/DE/Toolbox/Fiber_Tracts.html), y obtenidos a partir de secciones histológicas de cerebros humanos (Burgel *et al.*, 2006).

4.11. Procesamiento longitudinal de las imágenes de RM y PET-FDG cerebral

Con el objetivo de determinar si la conversión a EA se acompañó de cambios en alguno de los marcadores de neuroimagen empleados en el presente estudio (RM y/o PET-FDG), se realizó un seguimiento a los sujetos diagnosticados con DCLa transcurridos dos años y se volvieron a adquirir imágenes de RM y PET-FDG cerebral utilizando los mismos protocolos. De los 29 casos diagnosticados con DCLa, solo 23 decidieron continuar en el estudio (12 convirtieron a EA y 11 mantuvieron el diagnóstico de DCLa).

Estudios previos han mostrado que el propio fenómeno de envejecimiento introduce variaciones en las imágenes de RM cerebral que alteran los resultados de las comparaciones estadísticas basadas en diseños longitudinales (Fox & Schott, 2004). Además, transcurridos dos años podrían haberse producido ligeras modificaciones causadas por las actualizaciones del programa de adquisición, cambios sutiles en las intensidades de los gradientes, etc. (Meier

& Guttman, 2003; Jäger & Hornegger, 2009), aspectos que deberían ser corregidos *a priori* para evitar un sesgo en los resultados obtenidos a partir de los análisis longitudinales realizados con técnicas de VBM. Las posibles diferencias en el contraste de las imágenes de RM fueron neutralizadas mediante la aplicación de un procedimiento de ecualización de intensidades que ha mostrado su eficacia para homogeneizar contrastes de imágenes de RM cerebral (Delon, 2004). Brevemente, se deformaron los histogramas de intensidades de dos imágenes de RM a un histograma intermedio compuesto por el mismo patrón de frecuencias acumuladas de intensidades de grises, neutralizándose así las diferencias de contraste causadas por el proceso de adquisición. Posteriormente, se estableció el origen de coordenadas en el mismo punto para todas las imágenes, con el objetivo de realizar el procesamiento longitudinal de las imágenes de RM de acuerdo a los siguientes pasos: (i) se registraron las dos imágenes de RM cerebral de cada sujeto (año 1 y año 3) con un algoritmo de medio camino ("half-way registration"), obteniéndose una plantilla específica para cada sujeto (promedio de las imágenes registradas); (ii) se aplicó una corrección de artefactos a ambas imágenes; (iii) se segmentaron las imágenes en compartimentos de SG cortical y SB cerebral mediante el procedimiento implementado en el SPM8; (iv) se realizó un registro no lineal (DARTEL) para obtener los campos de deformación ("flow fields") individuales; (v) se normalizaron los dos compartimentos (SG cortical y SB cerebral) de todos los sujetos usando los campos de deformación; (vi) se aplicó una modulación a cada uno de los compartimentos (SG y SB) en el espacio MNI ajustada a los parámetros de normalización no lineal para controlar las diferencias individuales en el tamaño de la cabeza; y por último (vii) se corrigieron los efectos de volúmenes parciales mediante la aplicación de procedimientos de estimación adaptativa de máximos a posteriori y un modelo de campos aleatorios de Markov (Franke & Gaser, 2012; Ziegler *et al.*, 2012). Una vez finalizado el procesamiento longitudinal de las imágenes de RM, se crearon mapas diferencia (año 1 menos año 3) del volumen de la SG cortical y la SB cerebral en el espacio MNI para cada sujeto. Estos mapas diferencia fueron suavizados con un kernel gaussiano isotrópico de 14 mm.

La creación de una plantilla individual en el paso (i) y la estimación de los parámetros de normalización espacial basados en esta plantilla en el paso (v) aseguran un registro fiable de las imágenes adquiridas en dos momentos temporales diferentes, así como una normalización espacial idéntica en ambas imágenes para cada sujeto (Reuter *et al.*, 2012). Este procesamiento longitudinal es específico para imágenes de RM ponderadas en T1, debido a las correcciones de distorsiones y al procedimiento de segmentación empleado.

En el caso de las imágenes de PET-FDG cerebral, el procesamiento longitudinal fue diferente dado que la corrección por volúmenes parciales fue realizada durante la fase de post-procesamiento y, por lo tanto, las posibles diferencias debidas al proceso de adquisición ya estarían compensadas (Boellaard *et al.*, 2009). Por lo tanto, el procesamiento longitudinal de las imágenes de PET-FDG quedó de la siguiente forma: i) se registraron las dos imágenes de PET-FDG para cada sujeto (año 1 y año 3), empleando un algoritmo de medio camino ("half-way registration"); (ii) se promediaron ambas imágenes; (iii) se realizó una normalización espacial de cada sujeto al espacio MNI empleando esta imagen promedio; y finalmente (iv) se aplicaron los parámetros de normalización obtenidos con DARTEL a las imágenes registradas en el paso (i). Una vez finalizado el procesamiento longitudinal de las imágenes de PET-FDG, se crearon mapas diferencia (año 1 menos año 3) de consumo de glucosa cerebral en el espacio MNI para cada sujeto. Estos mapas diferencia fueron suavizados con un kernel gaussiano isotrópico de 14 mm.

4.12. Análisis estadísticos

Inicialmente, se evaluó el supuesto de normalidad de las variables demográficas, cognitivas, niveles de A β y de lípidos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Dado que todos estos parámetros mostraron una distribución normal, utilizamos pruebas estadísticas paramétricas para comparar sus valores medios entre grupos. Por lo tanto, las diferencias de grupo en cuanto a variables demográficas y cognitivas se evaluaron mediante la prueba T de Student,

mientras que la influencia del género o del efecto del genotipo ApoE $\epsilon 4$, al tratarse de variables categóricas, fue evaluada con la prueba chi cuadrado (χ^2). Por otra parte, las diferencias de grupo en los niveles de A β y de lípidos en sangre fueron evaluadas mediante un análisis multivariado de la covarianza (MANCOVA), ajustado por la edad y el género. Estos análisis fueron realizados con el programa SPSS v.15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Para evaluar las diferencias de grupo en los niveles de acoplamiento de fase del ritmo alfa (valores de PLI) se aplicó un test de permutaciones. Únicamente se compararon aquellos PLI cuyos valores fueron significativamente superiores al azar tras compararlos con el valor resultante del cuantil 95 de la distribución de PLIs surrogados (ver apartado 4.5.). En particular, se generaron 2.000 permutaciones mezclando aleatoriamente los sujetos de cada grupo. Para cada permutación se calculó un valor estadístico de T^2 (resultante de aplicar la prueba T de Student para muestras independientes) para cada PLI significativo, por lo que en cada permutación se obtuvo una nueva distribución en la que se seleccionó el valor máximo de T^2 . El resultado fue una distribución de 2.000 valores máximos de T^2 , en la que el cuantil 95 se empleó como umbral estadístico para establecer diferencias significativas entre los grupos (CN vs. DCLa; DCLa $\epsilon 4^+$ vs. DCLa $\epsilon 4^-$). Esta aproximación permitió controlar la tasa de error tipo I para todos los pares de electrodos conjuntamente (*family wise error*, FWE, siglas en inglés; Maris, 2004). Solo aquellos valores de PLI que mostraron diferencias entre grupos se incluyeron posteriormente en los análisis de regresión para estudiar la relación entre los cambios en la conectividad funcional EEG y la integridad anátomo-funcional cerebral (RM/PET-FDG) en CN y DCLa, separadamente.

Por otra parte, se evaluaron las diferencias entre grupos en el volumen de SG cortical y SB cerebral, así como en el volumen de SG y consumo de glucosa (FDG) de las regiones cerebrales que participan en la generación del ritmo alfa (cúneo, precúneo y tálamo). Estas comparaciones estadísticas se realizaron con el programa SPM8, empleando un ANCOVA ajustado por edad y género, así como por el volumen o consumo de glucosa de la máscara de

SG cortical o de SG de los generadores del ritmo alfa, o por el volumen de SB cerebral ($p < 0,05$; los falsos positivos se controlaron mediante FWE).

Para evaluar si las variaciones en la conectividad funcional EEG (valores de PLI) están relacionadas con cambios neuroanatómicos (volumen de SG cortical, SB cerebral, o de las estructuras generadoras del ritmo alfa) y/o neurometabólicos (consumo de glucosa cortical o de los generadores del ritmo alfa) (Figura 5, paneles L-O) en CN y DCLa, se realizaron análisis de regresiones lineales en cada vóxel en los que también se controló el efecto de la edad y el género, y el efecto del volumen/consumo de glucosa de la máscara sobre la que se hicieron los análisis. En este caso, los falsos positivos también se controlaron mediante FWE. Estos análisis de regresión se realizaron para cada grupo por separado y de forma independiente para cada PLI significativo, para así evitar relaciones espurias entre los diferentes PLI en el mismo modelo estadístico. Posteriormente, si la correlación alcanzó la significación en al menos uno de los grupos, se compararon las pendientes de regresión ($p < 0,05$; falsos positivos controlados por FWE). La dirección del contraste estadístico que se usó al comparar las pendientes de regresión de las correlaciones de ambos grupos se indicó como (CN > DCLa ó DCLa > CN; DCLa $\epsilon 4^+$ > DCLa $\epsilon 4^-$ o DCLa $\epsilon 4^-$ > DCLa $\epsilon 4^+$) y el sentido de la correlación (positiva o negativa) se señaló con los símbolos "+" y "-". A modo de ejemplo, el contraste CN⁺ > DCLa⁻ muestra un patrón de correlación opuesto en ambos grupos cuya pendiente de regresión fue significativamente diferente en CN respecto a los sujetos con DCLa. La misma aproximación estadística se siguió para evaluar la relación entre los niveles de A β (A β_{1-40} , A β_{1-42} , y el ratio A β_{1-42} /A β_{1-40}) o de lípidos en sangre (colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos y APOB) y el volumen de SG/SB o el consumo metabólico (PET-FDG) en todo el cerebro o solo en las regiones cerebrales generadoras del ritmo alfa.

Por otra parte, se estudió la relación entre los niveles de acoplamiento de fase del ritmo alfa (valores de PLI) y los niveles de A β (A β_{1-40} , A β_{1-42} , y el ratio A β_{1-42} /A β_{1-40}) o de lípidos en sangre (colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos y APOB) en cada grupo por separado, tras eliminar los efectos de la edad y el género ($p < 0,05$). Una vez más, las pendientes de regresión fueron

comparadas entre grupos cuando la correlación superó el umbral estadístico ($p < 0,05$) en al menos uno de los dos grupos.

Para evaluar estadísticamente si transcurridos dos años se observaron cambios cerebrales (SG/SB y consumo de glucosa) asociados a la evolución de DCLa a EA se realizaron dos ANCOVAs: (i) uno incluyó la variable sujetos para determinar los cambios de un año a otro en el grupo que convirtió a EA (cDCLa) y en el grupo que permaneció estable (ncDCLa) separadamente, incluyendo como covariables en ambos casos la edad, género y volumen o consumo de glucosa de la máscara utilizada para hacer los análisis; y (ii) otro en el que se determinaron las diferencias entre grupos en cada año tras eliminar los efectos de las covariables mencionadas anteriormente.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Características demográficas y cognitivas

La Tabla 1 contiene las características demográficas y cognitivas de los distintos grupos de sujetos que participaron en el estudio. Los grupos de CN y DCLa fueron homogéneos estadísticamente en cuanto a edad, género y años de educación, aspecto que se extendió a la comparación entre DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$. No obstante, hubo una tendencia hacia la significación en variables como la edad ($p < 0,08$) y el género ($p < 0,09$). Más concretamente, la edad promedio del grupo con DCLa fue ligeramente superior que la del grupo de CN y, además, incluyó más mujeres que hombres (justo lo contrario que sucedió en el grupo de CN). Por lo tanto, y para evitar cualquier efecto de estas dos variables sobre los resultados del presente estudio, se introdujeron como covariables en el modelo lineal general.

Tabla 1. Características demográficas y cognitivas.

	CN (N=26)	DCLa (N=29)	<i>p</i>	DCL $\epsilon 4^-$ (n=15)	DCL $\epsilon 4^+$ (n=14)	<i>p</i>
Edad (años)	66,5 ± 4,9	70,2 ± 6,8	0,08	68,6 ± 7,1	71,8 ± 6,2	0,2
Género (H/M)	15/11	10/19	0,09	3/12	7/7	0,09
Años educación	8,6 ± 4,3	8,2 ± 5,4	0,8	7,7 ± 5,2	8,8 ± 5,7	0,6
CDR	0	0,5	N/A	0,5	0,5	N/A
MMSE	28,3 ± 1,3	28,6 ± 2,6	0,01*	27,5 ± 2,6	26,0 ± 2,5	0,1
Memoria inmediata	14,2 ± 3,1	9,2 ± 2,9	10 ⁻⁶ *	10,3 ± 2,7	8,0 ± 2,7	0,03*
Memoria demorada	13,2 ± 2,9	5,6 ± 3,7	10 ⁻¹⁰ *	6,8 ± 3,9	4,3 ± 3,2	0,07

Los resultados muestran la media ± desviación estándar. CDR (Escala de Demencia Clínica) = 0 (ausencia de deterioro cognitivo), CDR = 0,5 (demencia cuestionable). MMSE: Mini Examen Cognoscitivo; CN: controles normales; DCLa: deterioro cognitivo leve de tipo amnésico; $\epsilon 4^-$: DCLa no portadores del genotipo ApoE $\epsilon 4$; $\epsilon 4^+$: DCLa portadores del genotipo ApoE $\epsilon 4$; H/M: Hombre/Mujer. * $p < 0,05$. N/A (no se puede aplicar estadística).

Las personas mayores con DCLa mostraron puntuaciones significativamente más bajas que los CN en determinadas pruebas neuropsicológicas. En concreto, presentaron un deterioro más acentuado de la función cognitiva global ($p < 0,01$), según se derivó de las puntuaciones obtenidas en el MMSE, y un rendimiento más bajo en las pruebas de memoria inmediata ($p < 10^{-6}$) y demorada ($p < 10^{-10}$). Los sujetos con DCLa $\epsilon 4^+$ también obtuvieron puntuaciones más bajas que los DCLa $\epsilon 4^-$ en las pruebas cognitivas anteriores, aunque estos resultados solo alcanzaron la significación estadística en el caso de la memoria inmediata ($p < 0,03$). Por lo tanto, la función cognitiva global y la memoria mostraron un mayor deterioro en el grupo DCLa que en el grupo CN, aspecto que se extendió, aunque de forma menos patente, a las personas mayores con DCLa $\epsilon 4^+$ cuando se compararon con los DCLa $\epsilon 4^-$.

El alelo $\epsilon 4$ del gen ApoE fue cuatro veces más frecuente en individuos con DCLa (N=14, todos ellos heterocigotos) que en CN (N=4, todos ellos heterocigotos). Los 15 DCLa restantes presentaron el genotipo ApoE $\epsilon 3/\epsilon 3$ (N=14) y $\epsilon 2/\epsilon 4$ (N=1).

5.2. Diferencias de grupo en los niveles de A β y lípidos en sangre

La Tabla 2 muestra los valores medios (\pm error estándar de la media) de los niveles de A β en plasma y de lípidos en suero para cada grupo de participantes. El MANCOVA mostró que los niveles de A β fueron significativamente diferentes al comparar CN con DCLa ($F_{3,49} = 5,2$; $p < 0,003$). Los análisis *post hoc* revelaron que las personas mayores con DCLa mostraban concentraciones significativamente más elevadas de A β_{1-40} ($p < 0,01$) y A β_{1-42} ($p < 0,001$) que los CN, mientras que el ratio A $\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ no mostró diferencias significativas entre grupos. Los niveles de A β_{1-40} y A β_{1-42} fueron estadísticamente similares al comparar los grupos DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$.

Tabla 2. Diferencias de grupo en los niveles de A β y lípidos en sangre.

Marcador	CN	DCLa	<i>p</i>
A β_{1-40} (pg/ml)	60,5 \pm 5,4	80,6 \pm 6,1	0,01*
A β_{1-42} (pg/ml)	8 \pm 0,3	10,1 \pm 0,5	0,001*
Ratio A β_{1-42} /A β_{1-40}	0,08 \pm 0,01	0,07 \pm 0,006	0,7
Colesterol total (mg/dl)	202,3 \pm 7,4	210,1 \pm 7,5	0,5
Colesterol LDL (mg/dl)	112,3 \pm 5,9	112,5 \pm 5,7	0,9
Colesterol HDL (mg/dl)	49 \pm 2,6	46,9 \pm 2,4	0,9
Triglicéridos (mg/dl)	121,9 \pm 8,5	123 \pm 8,2	0,9
APOB (mg/dl)	110,3 \pm 4,1	126 \pm 7,8	0,05*

Los resultados muestran la media \pm error estándar de la media. A β : beta amiloide; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; APOB: Apolipoproteína B. Valor de *p* procedente de los análisis *post hoc* derivados del MANCOVA ajustado por edad y género. **p* < 0,05.

Por otra parte, observamos que, de manera global, los niveles de lípidos difirieron significativamente entre CN y DCLa ($F_{5,47} = 2,48$; $p < 0,04$), aunque los análisis *post hoc* revelaron que solo las concentraciones de APOB mostraron valores significativamente más elevados en el grupo con DCLa respecto a los CN ($p < 0,05$). Los niveles de los diferentes marcadores de lípidos no se vieron influidos por la presencia/ausencia del alelo $\epsilon 4$ en los sujetos con DCLa.

5.3. Diferencias de grupo en los niveles de conectividad funcional EEG

La Figura 6 muestra las diferencias significativas en los niveles de acoplamiento de fase del ritmo alfa entre CN y DCLa (Figura 6A y 6C), y entre DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$ (Figura 6B y 6D). En ambas comparaciones estadísticas, las diferencias de grupo en los niveles de conectividad funcional EEG se mantuvieron estables en el tiempo, tanto a nivel intra-hemisférico como inter-hemisférico (paneles derechos de la Figura 6A y 6B). En los paneles izquierdos de la Figura 6A y 6B se representan los PLI que mostraron diferencias significativas entre grupos. En la Figura

6C y 6D se muestran las matrices de conectividad funcional EEG de cada grupo (paneles superiores), así como las diferencias significativas al comparar ambos grupos (paneles inferiores) ($p < 0,05$, corregido por FWE).

El grupo con DCLa mostró disminuciones significativas respecto a los CN en los niveles de acoplamiento de fase del ritmo alfa en 41 de los 780 PLI estudiados (5,25%). No se encontraron diferencias significativas en la dirección opuesta (*i.e.*, mayor acoplamiento de fase en el grupo DCLa que en CN). Más de la mitad de estos PLI significativos (51,2%) afectaron a la conectividad funcional inter-hemisférica, mientras que el 29,2% y el 19,5% impactaron sobre la conectividad funcional intra-hemisférica de los hemisferios izquierdo y derecho, respectivamente. Nótese que el deterioro de la conectividad funcional observado en el grupo con DCLa afectó en gran medida a la coordinación funcional inter-hemisférica entre regiones parietales derechas y temporales izquierdas (47,6% de los PLI inter-hemisféricos), así como a la conectividad funcional de la región parietal del hemisferio derecho, y a aquella entre regiones parietales y temporales del mismo hemisferio (35% de las conexiones intra-hemisféricas). Los resultados indican, por tanto, que los patrones de conectividad funcional EEG entre regiones parieto-temporales del hemisferio izquierdo son los más afectados en los individuos con DCLa .

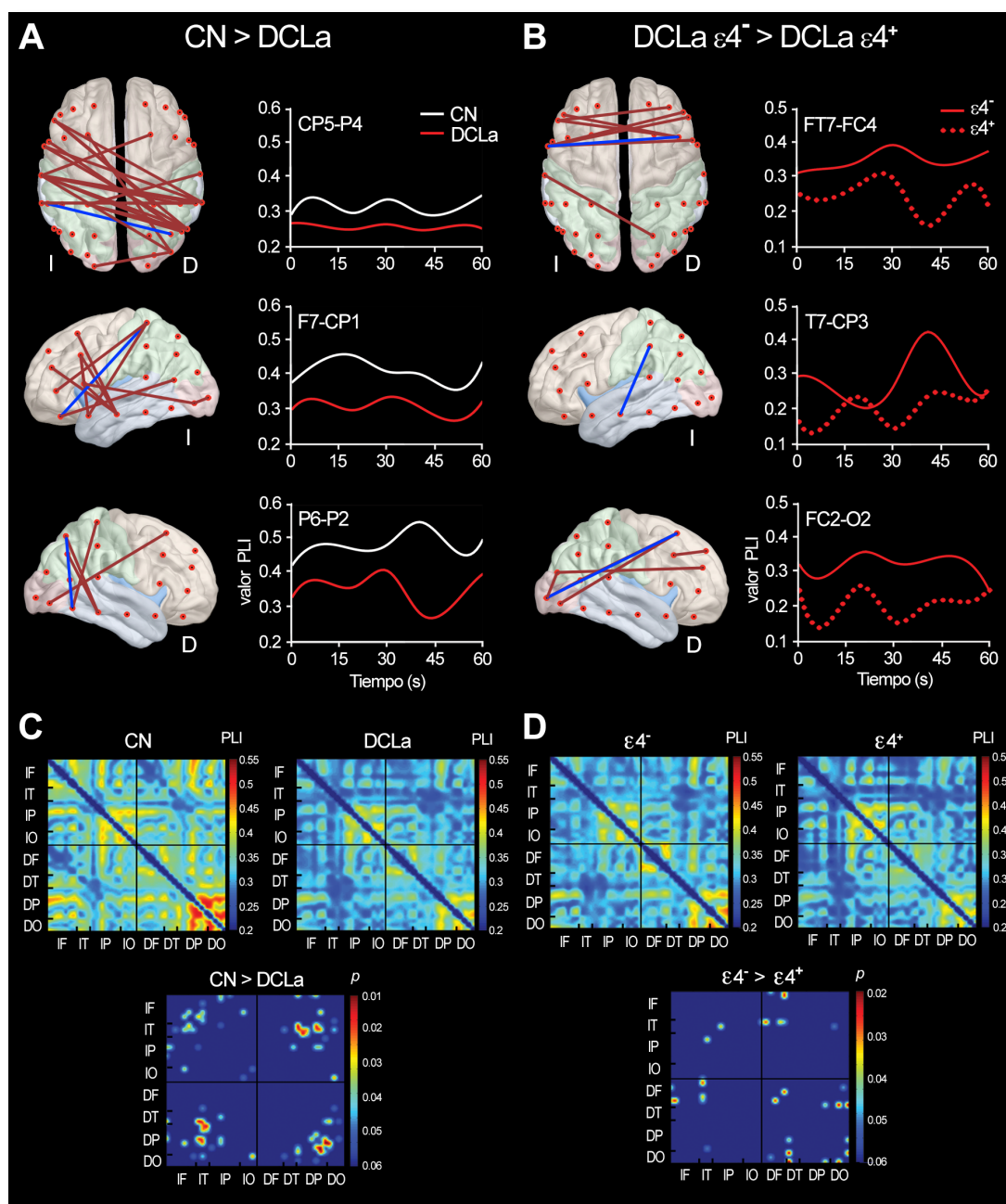


Figura 6. Diferencias de grupo en los niveles de acoplamiento de fase del ritmo alfa. **A** y **B** Los paneles izquierdos incluyen la representación de los PLI que mostraron diferencias significativas entre CN y DCLa en A y entre DCLa $\epsilon 4^-$ y DCLa $\epsilon 4^+$ en B. Los paneles derechos muestran la estabilidad temporal (60 s) de las diferencias de grupo en uno de los PLI significativos (marcado en azul en el panel izquierdo de las Figuras A y B). **C** y **D**. Matrices de conectividad funcional EEG de cada grupo (paneles superiores) y matrices de las diferencias significativas al comparar ambos grupos (paneles inferiores). I: Izquierdo; D: Derecho; F: Frontal; T: Temporal; P: Parietal; O: Occipital. $\epsilon 4^-$: DCLa que no presentaron el genotipo ApoE $\epsilon 4$; $\epsilon 4^+$: DCLa que presentaron el genotipo ApoE $\epsilon 4$.

El grupo DCLa $\epsilon 4^+$ también mostró una reducción significativa del acoplamiento de fase del ritmo alfa respecto a los DCLa $\epsilon 4^-$ en 16 de los 780 PLI estudiados (2%). No se encontraron diferencias significativas en la dirección opuesta. La mitad de estos PLI afectaron a la conectividad inter-hemisférica y la otra mitad a las conexiones intra-hemisféricas, sobre todo en el hemisferio derecho. Como se ilustra en la Figura 6B (panel izquierdo), el decremento de la conectividad funcional EEG afectó fundamentalmente a la comunicación inter-hemisférica del lóbulo frontal en el grupo DCLa $\epsilon 4^+$, aunque la conectividad funcional entre regiones frontales y parieto-occipitales del hemisferio derecho también se vio significativamente alterada.

5.4. Diferencias de grupo en el volumen y consumo de glucosa cerebral

Los resultados del presente estudio mostraron que el volumen de SG cortical, volumen de SB cerebral, y volumen de SG de los generadores cerebrales del ritmo alfa, fue significativamente menor en personas mayores con DCLa que en CN ($p < 0,05$, corregido por FWE).

La disminución de volumen de SG cortical mostrada por el grupo DCLa al compararlo con el grupo de CN se localizó en el giro parahipocampal del hemisferio izquierdo (Figura 7A). El tálamo también mostró una reducción bilateral, aunque más pronunciada en el hemisferio derecho, en el grupo DCLa que en los CN (Figura 7B). Así mismo, se observó una disminución de volumen de la SB cerebral en los sujetos con DCLa, respecto a los CN, que se extendió por los tractos mediales y laterales del cuerpo geniculado medial y lateral del tálamo, cuerpo calloso y región posterior del cíngulo (Figura 7C). La Tabla 3 contiene información detallada sobre estos cambios neuroanatómicos.

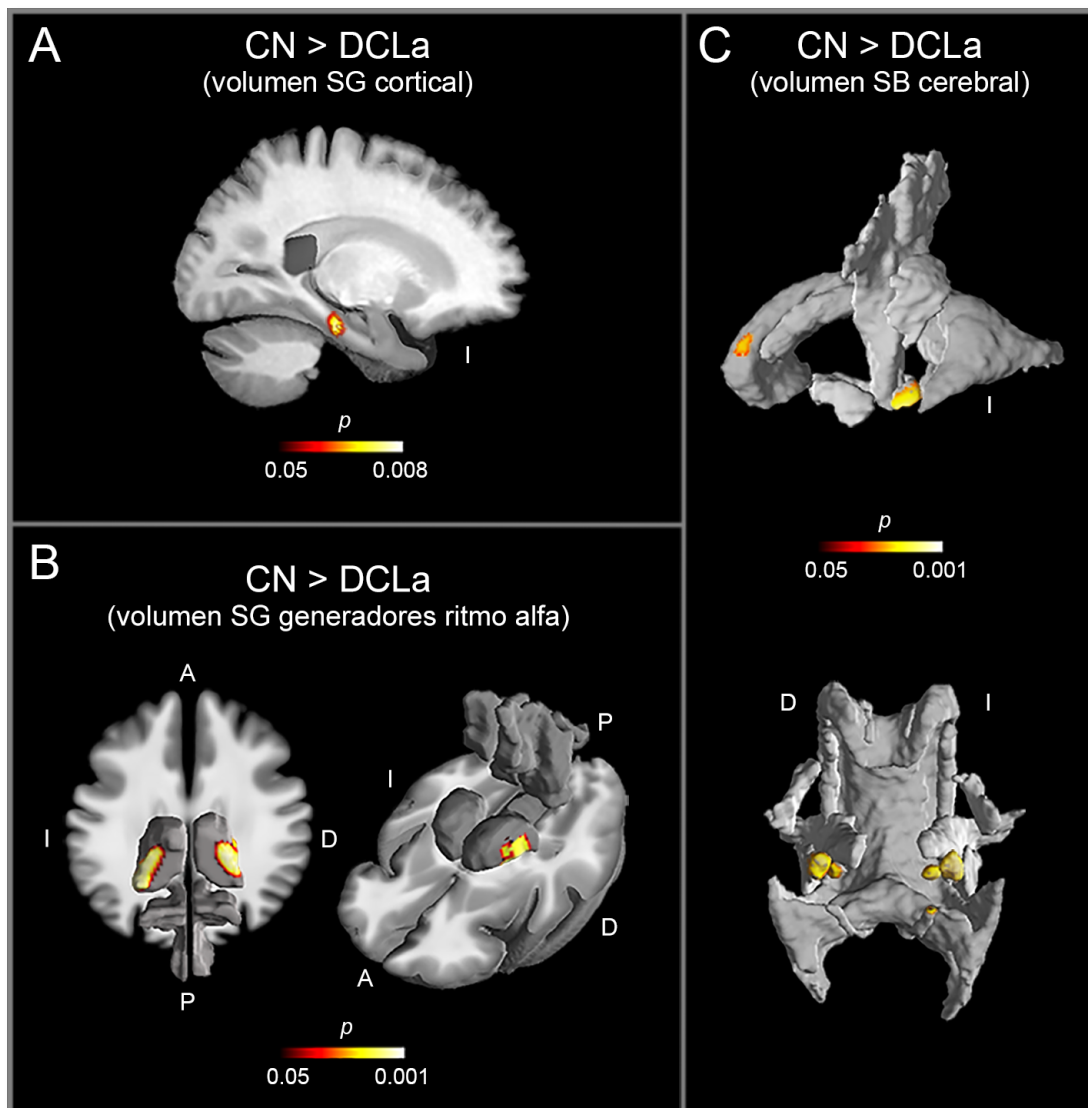


Figura 7. I Diferencias de grupo a nivel neuroanatómico (RM). **A.** Diferencias significativas de volumen de SG cortical al comparar CN con DCLa. **B.** Diferencias significativas de volumen de SG de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa al comparar CN con DCLa. **(C).** Diferencias significativas de volumen de SB cerebral al comparar CN con DCLa. I: Izquierdo; D: Derecho; A: Anterior; P: Posterior; SB: sustancia blanca; SG: sustancia gris. Análisis corregidos por FWE ($p < 0,05$).

Tabla 3. Diferencias de grupo en el volumen cerebral (RM).

Región cerebral	TC	x	y	z	T_{49}	p
Sustancia gris cortical						
I Giro parahipocampal (AB 35)	201	-16	-24	-21	5,29	0,008
Sustancia blanca cerebral						
I Cuerpo geniculado medial y lateral	1392	-24	-25	-15	5,99	0,0001
D Cuerpo geniculado medial y lateral	815	25	-24	-15	5,82	0,0003
I Cuerpo calloso	272	-27	38	10	5,20	0,002
I Cíngulo posterior	42	-19	-32	-16	5,81	0,0003
Generadores del ritmo alfa						
D Tálamo	1603	21	-16	-5	5,20	0,001
I Tálamo	471	-23	-22	-5	5,31	0,001

TC: tamaño del clúster (mm^3); I: hemisferio izquierdo; D: hemisferio derecho; AB: área de Brodmann; Las coordenadas (x y z) corresponden al espacio anatómico del atlas MNI. Valores T (el subíndice muestra los grados de libertad); Valor de p correspondiente a la comparación de grupos tras eliminar los efectos de la edad, género y volumen promedio de la máscara empleada en cada análisis ($p < 0,05$, corregido por FWE).

A nivel neurometabólico (PET-FDG), encontramos disminuciones significativas del consumo de glucosa cortical en el grupo DCLa respecto a los CN, que se localizaron bilateralmente en el giro angular, y en el precúneo y giro temporal medial del hemisferio derecho (Figura 8A). Además, se observó que algunas de las estructuras cerebrales involucradas en la generación del ritmo alfa mostraban una reducción del consumo metabólico en los individuos con DCLa en comparación con los CN (Figura 8B). Más concretamente, las estructuras más afectadas fueron el precúneo a nivel bilateral y el tálamo izquierdo. La Tabla 4 contiene información detallada sobre los cambios PET-FDG aquí mencionados.

No se encontraron diferencias significativas de volumen y/o de consumo de glucosa para ninguna al comparar los grupos DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$ mediante VBM (ni en SG cortical, ni en SB cerebral, ni en los generadores del ritmo alfa).

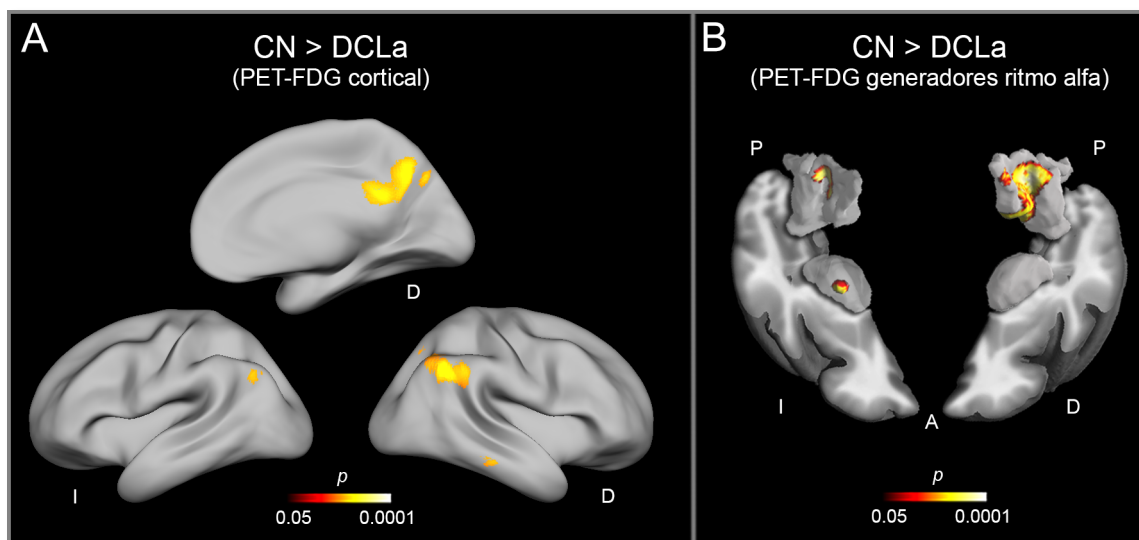


Figura 8. Diferencias de grupo en el consumo de glucosa cerebral (PET-FDG). **A.** Diferencias significativas de consumo metabólico cortical al comparar CN con DCLa. **B.** Diferencias significativas de consumo metabólico de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa al comparar CN con DCLa. I: Izquierdo; D: Derecho. A: Anterior; P: Posterior. Análisis corregidos por FWE ($p < 0,05$).

Tabla 4. Diferencias de grupo en el consumo de glucosa cerebral (PET-FDG).

Región cerebral	TC	x	y	z	T_{49}	p
Corteza cerebral						
D Giro angular (AB 39)	2135	47	-55	37	7,17	10^{-4}
D Precúneo (AB 7)	2943	9	-61	40	6,30	10^{-3}
I Giro angular (AB 39)	527	-39	-63	37	5,49	0,005
D Giro temporal medio (AB 21)	105	60	-30	-15	4,34	0,008
Generadores del ritmo alfa						
D Precúneo	4321	9	-61	40	6,31	10^{-4}
I Tálamo	154	-14	-16	3	4,27	0,02
D Precúneo	45	-17	-45	67	4,24	0,02
I Precúneo	24	-2	-39	34	4,42	0,01

TC: tamaño del clúster (mm^3); I: hemisferio izquierdo; D: hemisferio derecho; AB: área de Brodmann. Las coordenadas (x y z) corresponden al espacio anatómico del atlas MNI. Valores T (el subíndice muestra los grados de libertad); Valor de p correspondiente a la comparación de grupos tras eliminar los efectos de la edad, género y consumo de glucosa promedio en la máscara utilizada para cada análisis ($p < 0,05$, corregido por FWE).

5.5. Relación entre los cambios de conectividad funcional EEG y el volumen cerebral

Para evaluar la posible relación existente entre los cambios de acoplamiento de fase del ritmo alfa y los cambios de volumen cerebral (volumen de SG cortical/SB cerebral o volumen de SG de los generadores del ritmo alfa), realizamos un análisis de regresión lineal en cada grupo de sujetos (CN y DCLa) utilizando como regresores el volumen de SG cortical/SB cerebral, los PLI que mostraron diferencias significativas entre grupos (ver apartado 5.3.), la edad y el género. Cuando las correlaciones alcanzaron la significación en alguno de los dos grupos, se compararon estadísticamente las pendientes de regresión obtenidas en cada grupo.

Estos análisis revelaron que los patrones de conectividad funcional EEG se relacionan de forma diferente en cada grupo con la integridad de la SG cortical (Figura 9). Por una parte, se observó que el incremento de conectividad funcional entre regiones parietales y temporales (a nivel inter- e intra-hemisférico) y entre regiones parietales de ambos hemisferios correlaciona con el aumento de volumen del precúneo en sujetos con DCLa; mientras que en CN, el incremento de conectividad funcional inter-hemisférica entre el lóbulo parietal derecho y las regiones fronto-temporales izquierdas se relaciona con el aumento de volumen del giro angular. Estas correlaciones también difirieron cuando se compararon las pendientes de regresión entre los dos grupos, tal como se ilustra en la Figura 9. La Tabla 5 incluye información específica sobre estos cambios.

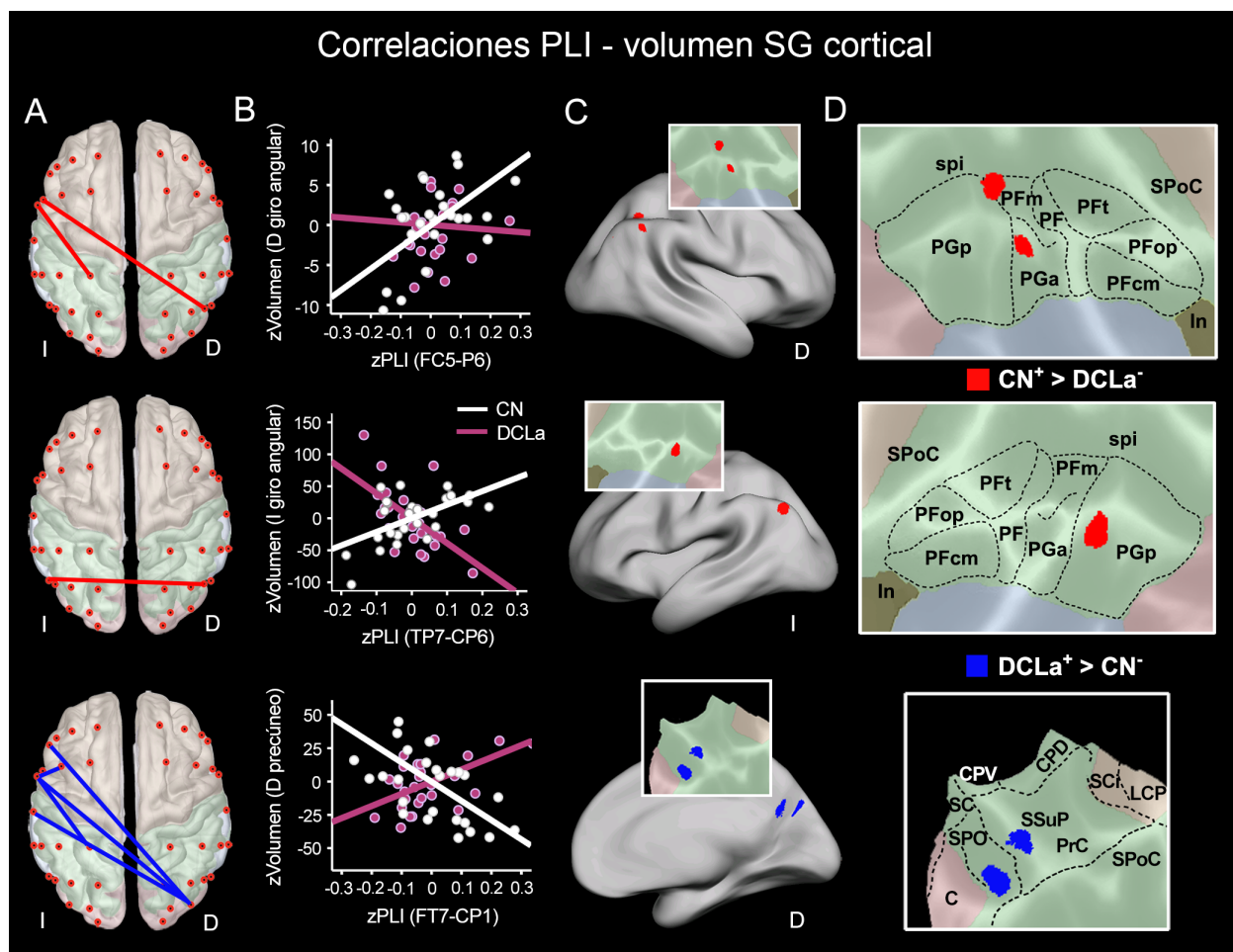


Figura 9. Diferencias de grupo en los patrones de correlación entre conectividad funcional EEG y volumen de SG cortical. **A.** PLIs que al correlacionarlos con la SG cortical sus pendientes de regresión difirieron significativamente entre CN y DCLa (las líneas en rojo indican que las correlaciones positivas de los CN fueron significativamente diferentes de los DCLa; las líneas en azul indican que las correlaciones positivas de los DCLa fueron significativamente diferentes de los CN). I: Izquierdo; D: Derecho. **B.** Comparación de las pendientes de regresión de ambos grupos (los valores de PLI y de volumen de SG cortical fueron normalizados a valores Z). **C.** Localización de estas diferencias de grupo en la superficie de la corteza inflada. **D.** Localización de estas diferencias de grupo en superficies corticales aplanadas derivadas de secciones histológicas de cerebros humanos *post mortem* (Casper *et al.*, 2006 para el lóbulo parietal inferior de los paneles superior y medio; Scheperjans *et al.*, 2008 para lóbulo parietal medial del panel inferior). Abreviaturas para el lóbulo parietal inferior: POC: surco postcentral; spi: surco parietal inferior; In: Ínsula; PGp: área angular posterior; PFm: área supramarginal magnocelular; PGa: área angular anterior; PF: área supramarginal; PFT: área supramarginal tenuicorticalis; PFcm: área supramarginal posterior; PFop: área supramarginal opercular. Abreviaturas para el lóbulo parietal medial: SPO: surco parietooccipital; SC: surco calcarino; CPV: cíngulo postventral; CPD: cíngulo postdorsal; SSuP: surco subparietal; PrC: precúneo; SCi: surco del cíngulo; LCP: lóbulo paracentral posterior; SPoC: surco postcentral; C: cúneo.

Tabla 5. Diferencias de grupo en las correlaciones entre los niveles de conectividad funcional EEG y el volumen de SG.

Comparación PLI	Región cerebral (AB)	TC	x	y	z	p
Sustancia gris cortical						
CN⁺ > DCLa⁻						
iT - iP (intra)	D Giro angular (AB 39)	363	34	-53	40	0,01
iF - dP (inter)	D Giro angular (AB 39)	136	45	-71	35	0,003
iT - dP (inter)	I Giro angular (AB 39)	981	-43	-66	37	0,01
iF - dP (inter)	D Precúneo (AB 31)	318	20	-72	32	0,01
DCLa⁺ > CN⁻						
iT - dP (inter)	D Precúneo (AB 31)	292	21	-71	33	0,01
iT - dP (inter)	D Precúneo (AB 31)	200	21	-73	31	0,01
iF - iT (intra)	D Precúneo (AB 31)	196	23	-68	29	0,01
iT - iP (intra)	D Precúneo (AB 31)	498	22	-70	31	0,003
	D Precúneo (AB 31)	72	26	-71	29	0,02
Generadores del ritmo alfa						
CN⁺ > DCLa⁻						
iF - dO (intra)	D Tálamo	18	26	-16	9	0,02

TC: tamaño del clúster (mm³); I/i = hemisferio izquierdo, D/d = hemisferio derecho; F = frontal, P = parietal, T = temporal, O = occipital; AB: Área de Brodmann. Las coordenadas (x y z) corresponden al espacio anatómico del atlas MNI. ^{+/−} muestra la dirección de la correlación en cada grupo. Los valores de p corresponden a los umbrales de significación obtenidos tras comparar las pendientes de regresión entre los dos grupos ($p < 0,05$, corregido por FWE). En todos los casos, las correlaciones intra-grupo únicamente fueron significativas en el grupo que mostró la correlación positiva.

En cuanto a las correlaciones entre los niveles de acoplamiento de fase del ritmo alfa y el volumen de SG de los generadores de este ritmo cerebral, los resultados revelaron una correlación positiva entre la conectividad funcional de las regiones fronto-occipitales y el volumen del tálamo en el grupo de CN ($p < 0,02$), que además fue significativamente diferente de la mostrada por el grupo con DCLa ($p < 0,04$). La Figura 10 muestra las diferencias al comparar las pendientes de regresión de los dos grupos, y la Tabla 5 contiene información detallada sobre estos cambios.

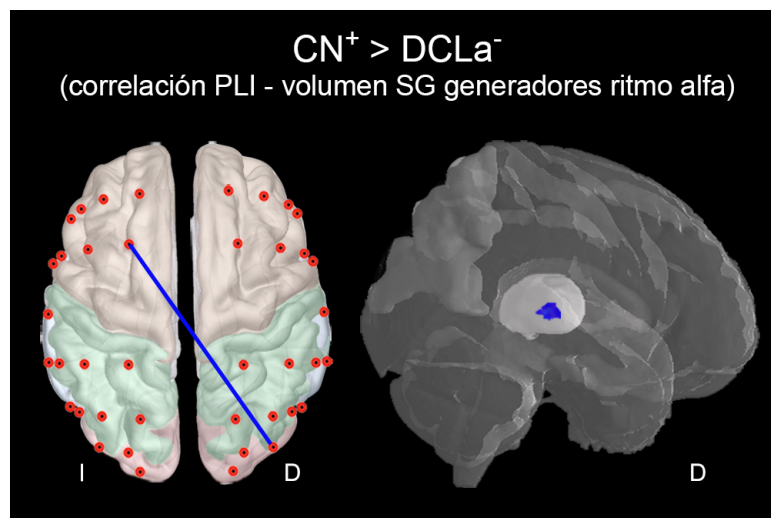


Figura 10. Diferencias de grupo en los patrones de correlación entre la conectividad funcional EEG y el volumen de SG de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa. Panel izquierdo: PLI que al correlacionarlo con el volumen de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa su pendiente de regresión difirió significativamente entre CN y DCLa (la línea en azul indica que la correlación positiva de los CN fue significativamente diferente de los DCLa). Panel derecho: localización de estas diferencias de grupo en un cerebro transparente ("glass brain"). I: Izquierdo; D: Derecho.

No se encontraron diferencias significativas en estos mismos análisis de regresión (correlaciones entre niveles de acoplamiento de fase y SG cortical o SG de los generadores de alfa) al comparar DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$.

La Figura 11 muestra las diferencias entre las correlaciones de cada grupo (comparación de pendientes de regresión) con el volumen de SB cerebral, y la Tabla 6 contiene información detallada sobre estos cambios. Los resultados mostraron correlaciones significativas entre el incremento de conectividad funcional inter-hemisférica parieto-temporal y el aumento de volumen del esplenio del cuerpo calloso del hemisferio izquierdo en los sujetos con DCLa.

No se encontraron diferencias significativas en estos mismos análisis de regresión (correlaciones entre niveles de acoplamiento de fase y SB cerebral) al comparar DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$.

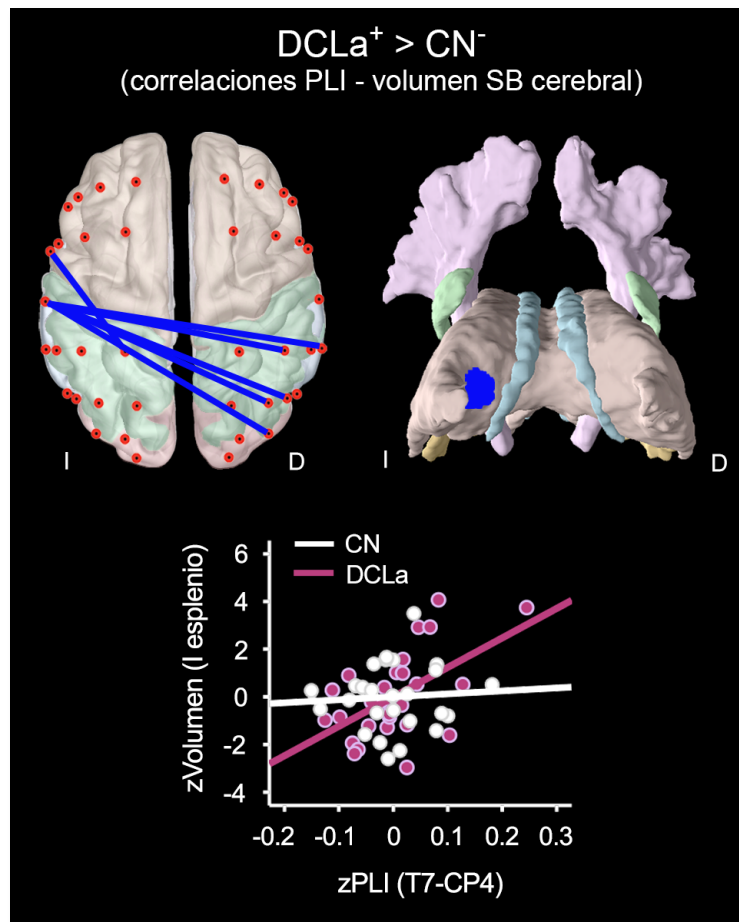


Figura 11. Diferencias de grupo en los patrones de correlación entre la conectividad funcional EEG y el volumen de la SB cerebral. Panel superior izquierdo: PLIs que al correlacionarlos con la SB cerebral sus pendientes de regresión difirieron significativamente entre CN y DCLa (las líneas en azul indican que las correlaciones positivas de los DCLa fueron significativamente diferentes de los CN). Panel superior derecho: localización de estas diferencias de grupo en los tractos de SB cerebral derivados de secciones histológicas de cerebros humanos *post mortem* (Burgel *et al.*, 2006). I: Izquierdo; D: Derecho. Panel inferior muestra las pendientes de regresión de ambos grupos en una de las correlaciones que alcanzaron la significación (los valores de PLI y de volumen de SB cerebral fueron normalizados a valores Z).

Tabla 6. Diferencias de grupo en las correlaciones entre los niveles de conectividad funcional EEG y el volumen de SB cerebral.

DCLa⁺ > CN⁻						
PLI	Tracto de sustancia blanca	TC	x	y	z	p
iT - dP (inter)	I Cuerpo calloso (esplenio)	51	-25	-53	8	0,001
iT - dP (inter)	I Cuerpo calloso (esplenio)	391	-26	-55	8	0,007
iT - dP (inter)	I Cuerpo calloso (esplenio)	254	-25	-57	7	0,01
			-24	-49	5	0,02
iT - dT (inter)	I Cuerpo calloso (esplenio)	1082	-24	-52	10	0,003
iT - dO (inter)	I Cuerpo calloso (esplenio)	138	-26	-56	10	0,01
iT - iP (intra)	I Cuerpo calloso (esplenio)	324	-28	-58	10	0,004

TC: tamaño del clúster (mm³); I/i = hemisferio izquierdo, D/d = hemisferio derecho; F = frontal, P = parietal, T = temporal, O = occipital; Las coordenadas (x y z) corresponden al espacio anatómico del atlas MNI. ^{+/-} muestra la dirección de la correlación en cada grupo. Los valores de *p* corresponden a los umbrales de significación obtenidos tras comparar las pendientes de regresión de los dos grupos (*p* < 0,05, corregido por FWE). En todos los casos solo el grupo con DCLa mostró una correlación positiva significativa (los CN mostraron correlaciones negativas que no superaron el umbral de significación).

5.6. Relación entre los cambios de conectividad funcional EEG y el consumo de glucosa cerebral

Con el objetivo de evaluar si los cambios de conectividad funcional EEG guardan relación con el consumo de glucosa cerebral (PET-FDG), realizamos un análisis de regresión lineal en cada grupo de sujetos siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior.

En relación con las asociaciones entre los cambios de conectividad funcional EEG y el consumo de glucosa de la corteza cerebral, encontramos correlaciones positivas significativas entre el patrón de conectividad funcional fronto-parietal del hemisferio izquierdo y el consumo de glucosa en regiones parietales (giro angular) y temporales (giro temporal y giro temporal medio) del mismo hemisferio en el grupo con DCLa ($0,008 < p < 0,04$), significaciones que se mantuvieron al comparar las pendientes de regresión de ambos grupos ($0,008 < p < 0,00001$). La Figura 12 muestra las diferencias entre las pendientes de regresión de cada grupo en las correlaciones entre el deterioro de la conectividad funcional EEG y el consumo metabólico de la corteza cerebral, y la Tabla 7 contiene información detallada sobre estos resultados.

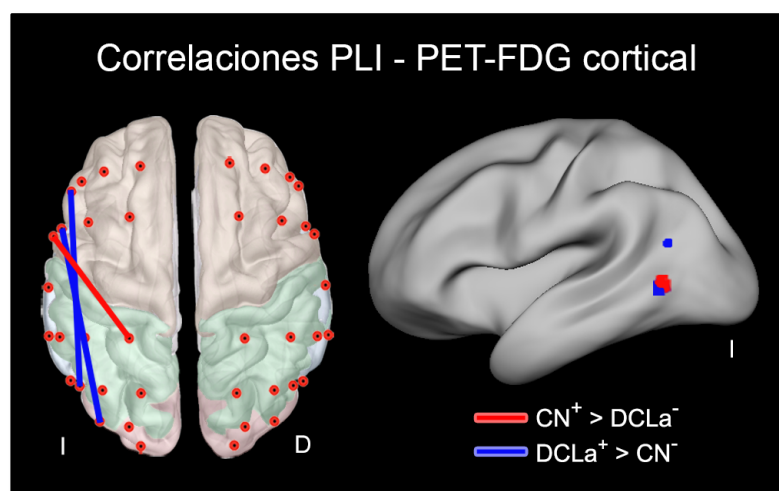


Figura 12. Diferencias de grupo en los patrones de correlación entre la conectividad funcional EEG y el consumo de glucosa cortical. Panel izquierdo: PLIs que al correlacionarlos con el consumo de glucosa cortical sus pendientes de regresión difirieron significativamente entre CN y DCLa (las líneas en rojo indican que las correlaciones positivas de los CN fueron significativamente diferentes de los DCLa; las líneas en azul indican que las correlaciones positivas de los DCLa fueron significativamente diferentes de los CN). Panel derecho: localización de estas diferencias de grupo en la superficie de la corteza inflada. I: Izquierdo; D: Derecho.

En cuanto a las correlaciones entre la conectividad funcional EEG y el consumo de glucosa de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa, se observaron correlaciones positivas entre la conectividad inter- e intra-hemisférica de regiones parietales y el metabolismo del precúneo derecho en el grupo de CN ($0,02 < p < 0,03$), diferencias que se extendieron a la comparación de las pendientes de regresión de ambos grupos ($0,004 < p < 0,02$). La Figura 13 muestra las diferencias entre las pendientes de regresión de cada grupo en las correlaciones entre el deterioro de la conectividad funcional EEG y el consumo de glucosa de los generadores del ritmo alfa, y la Tabla 7 contiene información detallada sobre estos resultados.

No se encontraron diferencias significativas en estos mismos análisis de regresión (correlaciones entre niveles de acoplamiento de fase y consumo metabólico cortical/generadores del ritmo alfa) al comparar DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$.

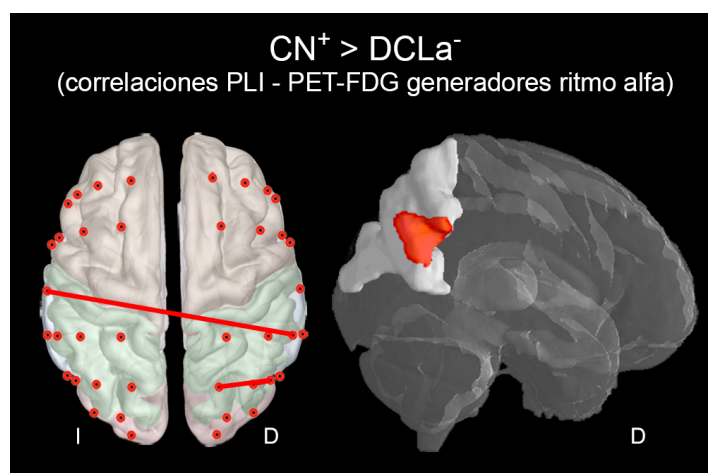


Figura 13. Diferencias de grupo en los patrones de correlación entre la conectividad funcional EEG y el consumo de glucosa de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa. Panel izquierdo: PLIs que al correlacionarlos con el consumo de glucosa de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa sus pendientes de regresión difirieron significativamente entre CN y DCLa (la línea roja indica que la correlación positiva de los CN fue significativamente diferente de los DCLa). Panel derecho: localización de estas diferencias de grupo en un cerebro transparente ("glass brain"). I: Izquierdo; D: Derecho.

Tabla 7. Diferencias de grupo en las correlaciones entre los niveles de conectividad funcional EEG y el consumo de glucosa cerebral (PET-FDG).

Comparación PLI	Región cerebral (AB)	TC	x	y	z	p
Sustancia gris cortical						
CN⁺ > DCLa⁻						
iT - iP (intra)	I Giro temporal inferior (AB 37)	141	-39	-61	9	0,01
DCLa⁺ > CN⁻						
iF - iP (inter)	I Giro temporal inferior (AB 37)	120	-51	-60	-6	0,008
iF - iO (inter)	I Giro angular (AB 39)	18	-41	-61	28	0,01
Generadores del ritmo alfa						
CN⁺ > DCLa⁻						
dP - dP (intra)	D Precúneo	873	-5	-67	42	0,004
iT - dP (inter)	D Precúneo	622	6	-49	25	0,01
dP - dP (intra)	D Precúneo	208	0	-61	36	0,02

TC: tamaño del clúster (mm³); I/i = hemisferio izquierdo, D/d = hemisferio derecho; F = frontal, P = parietal, T = temporal, O = occipital; AB: Área de Brodmann. Las coordenadas (x y z) corresponden al espacio anatómico del atlas MNI. ^{+/-} muestra la dirección de la correlación en cada grupo. Los valores de p corresponden a los umbrales de significación obtenidos tras comparar las pendientes de regresión entre los dos grupos ($p < 0,05$, corregido por FWE). En todos los casos las correlaciones intra-grupo únicamente fueron significativas en el grupo que mostró la correlación positiva.

5.7. Relación entre los niveles de A β en sangre y los cambios de conectividad funcional EEG, volumen cerebral y consumo de glucosa cerebral

Los análisis de regresión confirmaron una relación significativa entre la disminución de A β_{1-42} en sangre y el incremento de la conectividad funcional inter-hemisférica en el grupo de CN ($r = -0,64$; $p < 0,001$), aunque la comparación de las pendientes de regresión entre ambos grupos no alcanzó la significación estadística (Figura 14, panel izquierdo).

No se encontraron correlaciones significativas entre las concentraciones de A β (A β_{1-40} , A β_{1-42} , ratio A β_{1-42} /A β_{1-40}) y los cambios de volumen de SG cortical (o de los generadores del ritmo alfa), SB cerebral, o consumo de glucosa cortical (o de los generadores del ritmo alfa) ni en CN ni en DCLa.

Tampoco se encontraron correlaciones significativas entre las concentraciones de A β y los niveles de conectividad funcional EEG, cambios de volumen de SG cortical (o de los generadores del ritmo alfa), SB cerebral, o consumo de glucosa cortical (o de los generadores del ritmo alfa) en función de que los DCLa fueran o no portadores del gen ApoE $\epsilon 4$.

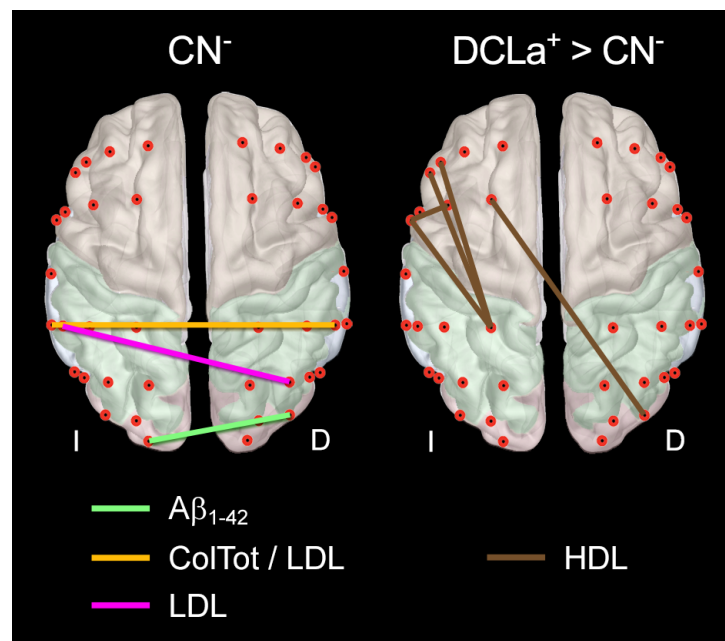


Figura 14. Correlaciones entre las concentraciones de A β /lípidos en sangre y los niveles de conectividad funcional EEG. El panel izquierdo muestra las correlaciones negativas significativas en el grupo de CN (no existieron diferencias significativas al comparar las pendientes de regresión entre ambos grupos). El panel derecho representa aquellas correlaciones cuyas pendientes de regresión fueron significativamente diferentes al comparar CN con DCLa (la línea marrón indica que las correlaciones positivas de los DCLa fueron significativamente diferentes de los CN). A β_{1-42} : beta amiloide péptido 42; ColTot: colesterol total; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; I: Izquierdo; D: Derecho.

5.8. Relación entre los niveles de lípidos en sangre y los cambios de conectividad funcional EEG, volumen y consumo de glucosa cerebral

Estos análisis mostraron relaciones significativas entre la disminución de los niveles de colesterol total y el aumento de la conectividad funcional EEG inter-hemisférica entre regiones parietales y regiones temporo-parietales en el grupo de CN ($r = -0,54$; $p < 0,005$), aunque no se encontraron diferencias significativas al comparar las pendientes de regresión arrojadas por ambos grupos. El mismo resultado se encontró para los niveles de colesterol LDL ($-0,57 < r < -0,47$; $0,003 < p < 0,01$) en el grupo de CN (Figura 14, panel izquierdo). En el grupo con DCLa, se observaron correlaciones positivas entre la concentración de colesterol HDL y los niveles de conectividad funcional intra- e inter-hemisférica ($0,47 < r < 0,41$; $0,01 < p < 0,02$). En este caso,

sí se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) al comparar las pendientes de regresión de los dos grupos (Figura 14, panel derecho).

Por otra parte, los análisis de regresión mostraron correlaciones significativas entre el incremento de los niveles de triglicéridos en sangre y la disminución bilateral del volumen de SG del precúneo en el grupo con DCLa ($0,57 < r < 0,5$; $0,001 < p < 0,01$). De nuevo, como se muestra en la Figura 15, estas correlaciones fueron significativamente más fuertes que las mostradas por los CN ($0,00002 < p < 0,01$). La Tabla 8 contiene información específica sobre estos contrastes.

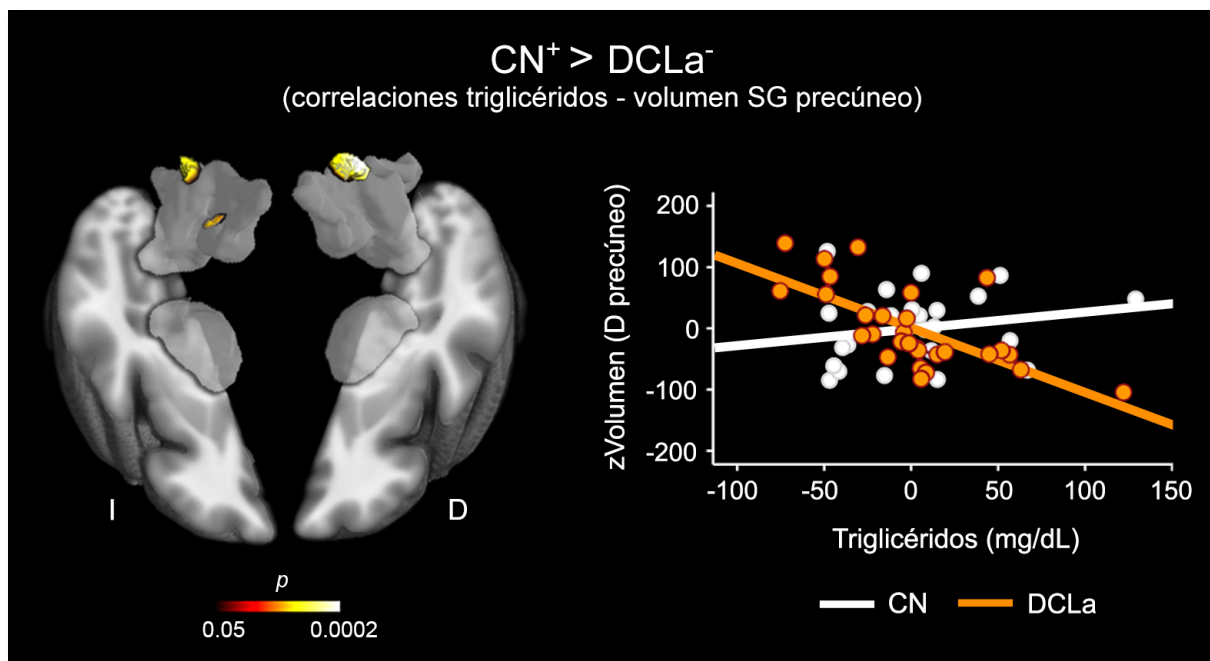


Figura 15. Correlaciones entre las concentraciones de triglicéridos y el volumen de SG de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa. El panel de la izquierda muestra la localización neuroanatómica de las correlaciones significativas. Análisis corregidos por FWE ($p < 0,05$). I: Izquierdo; D: Derecho. El panel de la derecha muestra las pendientes de regresión de ambos grupos en una de las correlaciones que alcanzaron la significación (los valores de PLI y de volumen de SG del precúneo fueron normalizados a valores Z).

Tabla 8. Diferencias de grupo (CN+ > DCLa-) en las correlaciones entre los niveles de triglicéridos en sangre y el consumo de glucosa (PET-FDG) de los generadores del ritmo alfa.

Región cerebral	TC	x	y	z	p
D Precúneo	669	14	-75	49	0,00001
I Precúneo	332	-9	-76	54	0,002
I Precúneo	90	-17	-40	63	0,01

TC: tamaño del clúster (mm^3); I/i = hemisferio izquierdo, D/d = hemisferio derecho; F = frontal, P = parietal, T = temporal, O = occipital. Las coordenadas (x y z) corresponden al espacio anatómico del atlas MNI. ^{+/-} muestra la dirección de la correlación en cada grupo. Los valores de p corresponden a los umbrales de significación obtenidos tras comparar las pendientes de regresión entre los dos grupos ($p < 0,05$, corregido por FWE). Solo las correlaciones positivas mostradas por el grupo de CN fueron significativas.

No se encontraron correlaciones significativas entre las concentraciones de lípidos en sangre y los niveles de conectividad funcional EEG, cambios de volumen de SG cortical (o de los generadores del ritmo alfa), SB cerebral, o consumo de glucosa cortical (o de los generadores del ritmo alfa) al comparar DCLa $\epsilon 4^+$ y DCLa $\epsilon 4^-$.

5.9. Evolución temporal de los diferentes marcadores

Con el objetivo de estudiar si la evolución temporal de los marcadores empleados en el presente trabajo permitía discriminar entre los DCLa que convirtieron a EA (cDCLa) y aquellos que no lo hicieron (ncDCLa), se empleó un diseño longitudinal que comparó estadísticamente la evolución temporal de cada marcador en cada uno de estos dos grupos. Los resultados de este análisis se incluyen en la Figura 16.

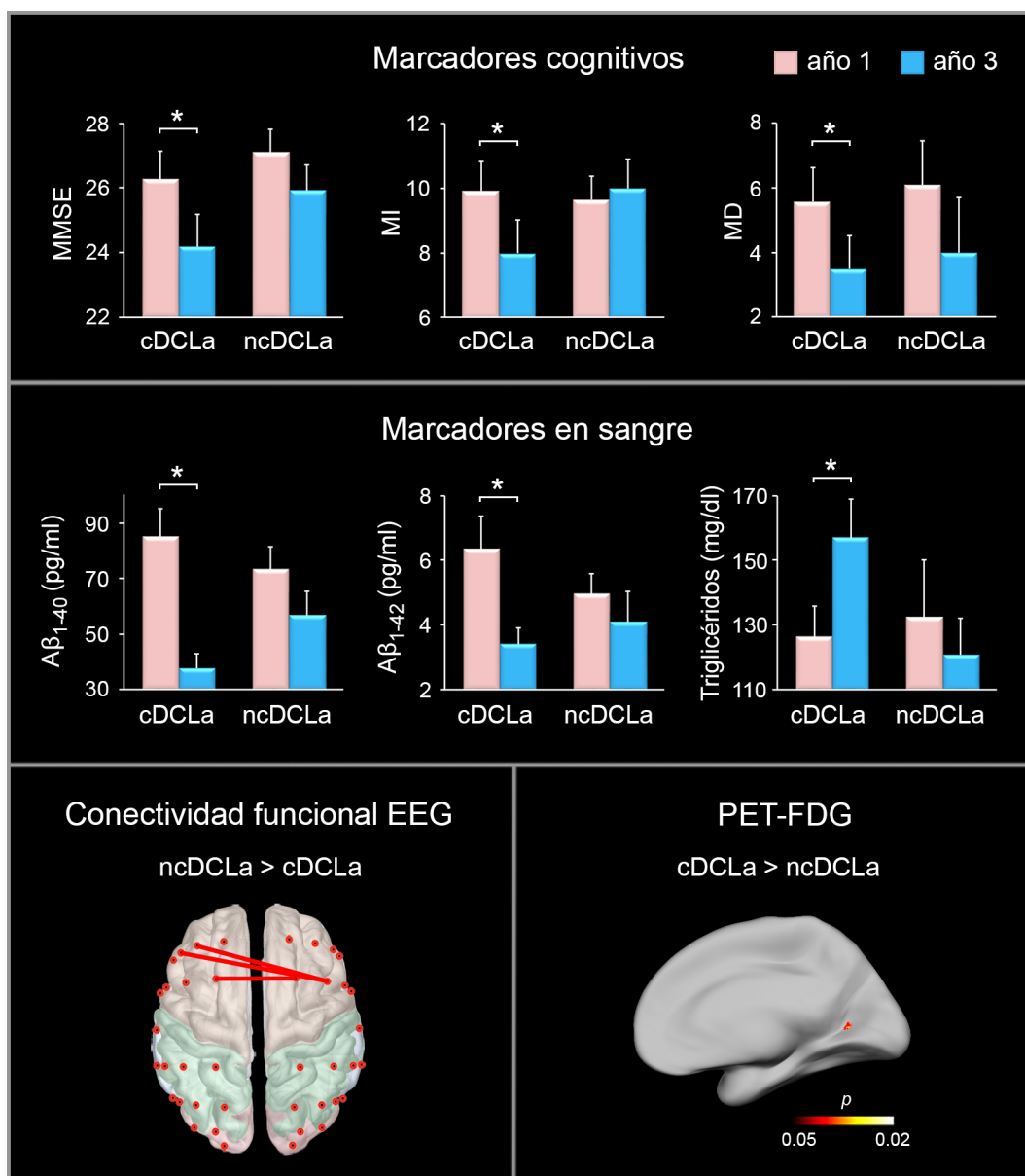


Figura 16. Evolución temporal de los diferentes marcadores en sujetos cDCLa y ncDCL. En el panel superior se muestran las diferencias significativas en los marcadores cognitivos al comparar año 1 y año 3 en cada grupo. En el panel medio se muestran las diferencias significativas en los marcadores en sangre al comparar año 1 y año 3 en cada grupo. En el panel inferior izquierdo se muestran las diferencias significativas en conectividad funcional EEG al comparar ambos grupos en la línea base (año 1). En el panel inferior derecho se muestran las diferencias significativas en el consumo de glucosa de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa al comparar ambos grupos en la línea base (año 1) (análisis corregidos por FWE ($p < 0,05$)). MMSE: Mini-Mental State Examination; MI: memoria inmediata; MD: memoria demorada; Aβ₁₋₄₀: beta amiloide péptido 40; Aβ₁₋₄₂: beta amiloide péptido 42.

5.9.1. Marcadores cognitivos

El MANCOVA mostró que el grupo con cDCLa presentaba puntuaciones significativamente más bajas en las diferentes pruebas cognitivas transcurridos dos años ($F_{3,9} = 8,6$; $p < 0,005$), aspecto que no se evidenció en el grupo ncDCL. Más específicamente, y como se ilustra en la Figura 16 (panel de marcadores cognitivos), se observó que el grupo cDCLa mostró un deterioro progresivo de la función cognitiva global evaluada con el MMSE ($p < 0,005$), así como de la memoria inmediata ($p < 0,02$) y demorada ($p < 0,03$).

5.9.2. Marcadores de A β y lípidos en sangre

El grupo cDCLa también mostró cambios significativos en los niveles de A β con el paso del tiempo ($F_{3,9} = 4,7$; $p < 0,03$). En particular, se encontró una disminución significativa de los niveles de A β_{1-40} ($p < 0,002$) y A β_{1-42} ($p < 0,02$). Los marcadores de lípidos también variaron globalmente del año 1 al año 3 en el grupo cDCLa ($F_{3,9} = 3,7$; $p < 0,05$), aunque solo la concentración de triglicéridos mostró un aumento significativo en los contrastes univariados ($p < 0,007$). Estos resultados se muestran en la Figura 16 (panel de marcadores en sangre).

5.9.3. Marcadores de conectividad funcional EEG

La evolución temporal de los niveles de acoplamiento de fase del ritmo alfa no permitió distinguir a los cDCLa de los ncDCLa. Sin embargo, se encontró que la conectividad funcional inter-hemisférica entre regiones frontales mostró una reducción significativa en el grupo cDCLa respecto a los ncDCLa en el momento del reclutamiento ($F_{3,17} = 4,8$; $p < 0,01$), afectando específicamente a los pares de electrodos F3-FC4 ($p < 0,02$), F1-FC4 ($p < 0,004$) y FC3-FC2 ($p < 0,003$) tal como se ilustra en la Figura 16 (panel de conectividad funcional EEG). Es decir, el grupo cDCLa presentaba un mayor deterioro de la coordinación funcional inter-hemisférica del lóbulo frontal dos años antes de que se produjera el diagnóstico clínico de EA en comparación con el grupo DCLa que permaneció estable tras este intervalo de tiempo.

5.9.4. Marcadores neuroanatómicos y de consumo de glucosa cerebral

La evolución temporal de los cambios anatómicos (*i.e.*, volumen de SG cortical, SB cerebral, y SG de los generadores del ritmo alfa) y del consumo de glucosa regional (*i.e.*, de toda la corteza y de los generadores del ritmo alfa) no permitió diferenciar a los cDCLa de los ncDCLa. Sin embargo, y tal como ocurrió con los marcadores de conectividad funcional EEG, observamos que el cúneo ya mostraba una hiperactivación significativa en el grupo cDCLa respecto a los ncDCLa en el momento del reclutamiento ($p < 0,02$, corregido por FWE). Por lo tanto, el grupo de DCLa que acabó siendo diagnosticado con EA en los dos años siguientes presentó en desde el momento del reclutamiento una actividad anormal de la corteza occipital, uno de los principales generadores neuroeléctricos del ritmo alfa. Este resultado se ha representado en la Figura 16 (panel PET-FDG).

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El cerebro humano está formado por una exquisita combinación de conexiones nerviosas y patrones de sincronización neuronal que hacen posible que el procesamiento sensorial, los actos motores y las funciones cognitivas muestren una precisión y complejidad inalcanzables por cualquier sistema de computación artificial. Las lesiones que caracterizan a la EA producen, desde sus estadios más tempranos, alteraciones sinápticas que, en último extremo, desembocan en una muerte neuronal progresiva (DeKosky & Scheff, 1990; Terry *et al.*, 1991). Independientemente de si la acumulación de A β subyace o no a la patogénesis de la EA, cada vez más evidencias apuntan a que los niveles elevados de oligómeros de A β soluble están relacionados con el deterioro de la función sináptica en los pacientes con EA (Cheng *et al.*, 2007; Walsh & Selkoe, 2007; Selkoe, 2008; Zahs & Ashe, 2013), alterando el funcionamiento de circuitos neurales (Hsia *et al.*, 1999; Palop *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2013) y, por ende, de los patrones de sincronización neuronal de la corteza cerebral (Babiloni *et al.*, 2004; Greicius *et al.*, 2004; Stam *et al.*, 2006; Brier *et al.*, 2012). Aunque estas lesiones afectan de manera heterogénea a distintas regiones cerebrales, son especialmente abundantes en determinadas estructuras corticales (Buckner *et al.*, 2009), afectando de manera muy particular a las neuronas piramidales (Arnold *et al.*, 1991) y a los haces de fibras largas que conectan regiones cerebrales distantes (Liu *et al.*, 2014). Todas estas evidencias no han hecho sino fortalecer la hipótesis de la EA como un síndrome de desconexión cerebral (De Lacoste & White, 1993; Delbeux *et al.*, 2003; Bokde *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Reid & Evans, 2013).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen a reforzar esta hipótesis al mostrar una disminución de los niveles de acoplamiento de fase del ritmo alfa entre regiones parieto-temporales en el grupo con DCLa respecto a los CN, y entre regiones del lóbulo frontal en los DCLa portadores del genotipo ApoE ϵ 4 respecto a los DCLa no portadores (González-Escamilla *et al.*, en prensa_a), y en los DCLa que terminaron desarrollando la EA transcurridos dos años desde el reclutamiento.

De acuerdo con nuestras hipótesis de trabajo, las alteraciones del acoplamiento de fase del ritmo alfa mostradas por las personas mayores con DCLa se relacionan con cambios anátomo-funcionales que, además de afectar a los generadores del ritmo alfa, se extienden por otras estructuras corticales que acumulan A β años antes que se produzca el diagnóstico clínico de la EA. Más concretamente, hemos encontrado que la disminución de conectividad funcional EEG está relacionada (i) con una atrofia bilateral del tálamo y un hipometabolismo del precúneo (González-Escamilla *et al.*, en prensa_b), dos estructuras cerebrales claves en la generación del ritmo alfa humano (Cantero *et al.*, 2009); (ii) con cambios de volumen de la SG que afectan a diversas regiones parietales, y con atrofas de la SB en la región más posterior del cuerpo calloso (González-Escamilla *et al.*, en prensa_a); así como (iii) con un hipometabolismo de las regiones parieto-temporales del hemisferio izquierdo.

No obstante, y a pesar de que las personas con DCLa muestran una reducción significativa de los niveles de conectividad funcional EEG, nuestros experimentos también revelaron que estos niveles de conectividad funcional aumentan a medida que lo hacen las concentraciones de colesterol HDL en el grupo con DCLa. Esta relación sugiere que el incremento de los niveles de HDL podría tener un efecto neuroprotector en personas mayores con DCLa (González-Escamilla *et al.*, en prensa_b), proporcionando soporte experimental a hipótesis anticipadas en estudios previos (McGrowder *et al.*, 2011). Por último, merece la pena destacar que si bien las alteraciones de la conectividad funcional EEG no parecen guardar ninguna relación con los marcadores en sangre utilizados en el presente estudio, algunos de estos marcadores (A β y triglicéridos) fueron de utilidad para diferenciar entre sujetos DCLa que desarrollaron EA y aquellos que permanecieron estables transcurridos dos años.

En resumen, los resultados de este trabajo sugieren que las alteraciones de la conectividad funcional del ritmo alfa registrado en condiciones de vigilia relajada con ojos cerrados son un importante correlato funcional de los cambios anátomo-funcionales cerebrales que cursan con el DCLa, mostrando su utilidad a la hora de discriminar entre las trayectorias de envejecimiento normal y patológico.

6.1. Correlatos neuroanatómicos del deterioro de la conectividad funcional EEG en personas mayores con DCLa

La progresión neuropatológica de la EA en la neocorteza muestra una evolución espacio-temporal que impacta inicialmente sobre regiones temporales mediales, parietales, y frontales mediales, hasta terminar afectando a regiones visuales primarias y secundarias (Corder *et al.*, 2000). Aunque la acumulación de agregados de A β no está directamente relacionada con la muerte celular en estas regiones, estudios realizados en modelos animales de EA han puesto de manifiesto su relación con profundas alteraciones en la morfología dendrítica de estas neuronas (Knowles *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2004). Estas alteraciones dendríticas se acompañan de un incremento de las disfunciones sinápticas y de una disminución en la densidad de sinapsis (revisado en Knobloch & Mansuy, 2008), aspectos que podrían ser parcialmente responsables de las alteraciones cognitivas que padecen los pacientes con EA (DeKosky & Scheff, 1990; Terry *et al.*, 1991). De hecho, cuando los oligómeros de A β extraídos de cerebros de pacientes con EA se han introducido en el hipocampo de ratas normales, no solo se ha visto afectada la plasticidad sináptica sino también la capacidad para recuperar aprendizajes adquiridos previamente en una tarea de evitación (Shankar *et al.*, 2008). Diferentes estudios han mostrado que la mayor acumulación de A β se concentra en las capas III y IV de la corteza cerebral (Terry *et al.*, 1981; Rogers & Morrison, 1985; Lewis *et al.*, 1987; Hof *et al.*, 1990; Arnold *et al.*, 1991), afectando a las neuronas piramidales que participan en la generación de las oscilaciones EEG (Silva *et al.*, 1991; Lopes da Silva & Van Rotterdam, 1993). Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que el deterioro cognitivo progresivo que caracteriza a la EA podría ser el resultado de las acumulaciones de A β , dados sus efectos demostrados sobre la transmisión sináptica y los mecanismos de plasticidad neuronal.

No obstante, aún se desconoce por qué la patología de la EA sigue un patrón topográfico tan estereotipado. Se ha llegado a proponer que la propagación de la patología se relaciona con los mecanismos de plasticidad neuronal (Woollet *et al.*, 2009), de manera que las regiones cerebrales que muestran un mayor grado de plasticidad serían también las más vulnerables

ante esta patología. Ello explicaría por qué el hipocampo y las regiones a las que envía proyecciones nerviosas son las primeras afectadas. Las alteraciones de la transmisión sináptica se acompañarían, probablemente como resultado de un proceso de degeneración walleriana, en atrofas de la SG y SB. En línea con esta hipótesis, los resultados de este trabajo apuntan a que las alteraciones de la conectividad funcional EEG mostradas por el grupo con DCLa se relacionan con atrofas en ambos compartimentos cerebrales.

De acuerdo con estudios previos que han mostrado patrones aberrantes de conectividad funcional EEG entre el precúneo y otras regiones corticales en personas mayores con DCLa (Cantero *et al.*, 2009; Knyazeva *et al.*, 2013), nuestros resultados han mostrado una correlación negativa entre la conectividad funcional EEG y el volumen del precúneo en el grupo con DCLa (González-Escamilla *et al.*, en prensa_a). Esta relación aberrante entre estructura y función cerebral podría ser el resultado de una disfunción sináptica derivada de la acumulación de agregados de A β en esta estructura del lóbulo parietal desde estadios tempranos de la enfermedad (Rowe *et al.*, 2007; Driscoll *et al.*, 2012), la cual provocaría reacciones inflamatorias en respuesta a la neurotoxicidad de A β depositado. En línea con esta hipótesis, experimentos *in vitro* han mostrado que las concentraciones elevadas de A β_{1-42} en corteza cerebral durante un tiempo prolongado se acompañan de patrones de hipersincronización neuronal (Wang *et al.*, 2009), por lo que es posible que un mecanismo similar esté actuando a nivel regional en el precúneo de las personas mayores con DCLa. Una explicación alternativa podría ser la puesta en marcha de mecanismos cerebrales compensatorios previamente a que se produzca la muerte neuronal en determinadas centros de integración cortical, como es el caso del precúneo. En esta dirección, algunos trabajos histopatológicos han mostrado una hipertrofia de neuronas corticales en personas mayores con EA asintomática (Riudavets *et al.*, 2007; Iacono *et al.*, 2008), además de un incremento del espesor cortical del precúneo en personas portadoras de la mutación del gen de la presenilina-1 (Fortea *et al.*, 2010).

El precúneo juega un papel importante en los procesos de integración visuoespacial y en la recuperación de memorias episódicas (Cavanna & Trimble, 2006), además de ser la región de

la red por defecto que muestra una mayor actividad basal durante el estado de reposo cerebral (Wang *et al.*, 2006). Esta región también presenta una reducción de los niveles de ChAT en pacientes con EA (Ikonomovic *et al.*, 2011), motivada quizás por la pérdida de conexiones colinérgicas procedentes del núcleo basal de Meynert (Mesulam *et al.*, 1983) y/o por la disminución de los niveles de conectividad funcional con el hipocampo (Kim *et al.*, 2013). Además, estudios recientes con PET-PiB (compuesto B de Pittsburgh marcado con C-11) han mostrado concentraciones elevadas de A β en el precúneo de pacientes con EA, que han sido confirmadas posteriormente en estudios *post mortem* (Driscoll *et al.*, 2012).

También hemos mostrado que la reducción de la conectividad funcional EEG y del volumen del giro angular son dos fenómenos que ocurren en paralelo en el grupo con DCLa (González-Escamilla *et al.*, en prensa_a). Es posible, por tanto, que distintos subsistemas del lóbulo parietal contribuyan de manera diferente al deterioro de los patrones de conectividad funcional EEG en esta población. Este resultado ha sido recientemente confirmado en estudios de RMf en estado de reposo cerebral en personas mayores con DCLa (Liang *et al.*, 2012). El giro angular es una región del lóbulo parietal inferior que junto con el precúneo participa en procesos de memoria episódica (Johnson *et al.*, 2013) y en la integración de la información con esquemas previos de conocimiento (Binder *et al.*, 2009; van Buuren *et al.*, 2014), y cuya actividad durante el estado de reposo cerebral correlaciona con la del sistema de memoria hipocámpico-cortical en estudios de RMf (Vincent *et al.*, 2008). Por otra parte, el giro angular muestra una disminución de espesor cortical en pacientes con EA leve (Dickerson *et al.*, 2009), además de una disminución de la conectividad funcional asociada al incremento de la concentración de PiB en personas mayores sanas (Mormino *et al.*, 2011), formando parte de los cambios en la coordinación de los sistemas corticales asociados al envejecimiento normal.

La pérdida de sincronía EEG entre regiones corticales distantes podría deberse en parte a una disminución de la densidad de fibras nerviosas y de la velocidad de conducción axonal, dos factores que se encuentran intrínsecamente relacionados con la integridad de los tractos largos de SB cerebral. Estos descriptores de la SB han sido incorporados recientemente en modelos

cerebrales mesoscópicos para mejorar nuestro conocimiento sobre los factores que determinan el acoplamiento de las oscilaciones EEG a nivel local y entre regiones distantes (Sotero *et al.*, 2007; Pons *et al.*, 2010). Además, evidencias recientes han contribuido a reforzar la idea de que la microestructura de la SB es el predictor más fiable de la sincronización cortical que subyace al ritmo alfa en humanos (Valdés-Hernández *et al.*, 2010).

Las lesiones de SB son evidentes en un 60% de los estudios *post mortem* realizados en pacientes con EA, y se han atribuido fundamentalmente a una hipoperfusión de la región afectada (Brun & Englund, 1986). La relación entre la integridad de la SB cerebral y la conectividad funcional entre regiones corticales ha comenzado a arrojar sus primeros resultados en el envejecimiento normal (Andrews-Hanna *et al.*, 2007) y en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Seeley *et al.*, 2009). Mediante la combinación de registros de EEG e imágenes de DTI, Teipel y colaboradores (2009) han mostrado que el grado de coherencia inter-hemisférica de la banda alfa en las regiones frontales correlaciona significativamente con los niveles de difusividad de la SB del cuerpo calloso, lóbulo frontal, tálamo, puente y cerebelo, en personas mayores sanas y en aquellas con DCLa, aunque su aproximación no fuera capaz de discriminar entre ambos grupos.

El cuerpo calloso es una estructura esencial para la comunicación cerebral inter-hemisférica (Innocenti, 1986), facilitando también la coordinación funcional inter-hemisférica de las oscilaciones alfa (Koeda *et al.*, 1995). Estudios previos han mostrado una disminución de los niveles de coherencia inter-hemisférica en pacientes con EA (Wada *et al.*, 1998; Stam *et al.*, 2006), lo cual podría deberse a la reducción del volumen del cuerpo calloso observada en estos pacientes (Hampel *et al.*, 2002; Pogarell *et al.*, 2005). Nuestro trabajo extiende esta relación a personas mayores con DCLa. Más concretamente, nuestros resultados han puesto de manifiesto que la disminución del volumen del esplenio del cuerpo calloso está estrechamente relacionada con la reducida coordinación funcional inter-hemisférica existente entre regiones temporales y parietales que muestran los sujetos con DCLa. Este hallazgo encuentra soporte experimental adicional en dos líneas de evidencias. En primer lugar, en el

esplenio del cuerpo calloso se originan proyecciones nerviosas que alcanzan las regiones visuales posteriores, incluyendo la corteza occipital y parietal (Putnam *et al.*, 2010), consideradas como los principales generadores corticales del ritmo alfa en mamíferos superiores (Lopes da Silva & Storm Van Leeuwen 1977; Cantero *et al.*, 2002). Y en segundo lugar, diferentes estudios han mostrado lesiones en el esplenio del cuerpo calloso incluso en las fases prodrómicas de la EA (Wang *et al.*, 2006; Mielke *et al.*, 2009; Di Paola *et al.*, 2010a, b; Zhuang *et al.*, 2010; Delano-Wood *et al.*, 2012). De hecho, un estudio relativamente reciente ha encontrado que los niveles de anisotropía del esplenio del cuerpo calloso y del fórnix permiten discriminar mejor a los sujetos con DCLa de las personas mayores sanas (Zhuang *et al.*, 2010).

6.2. Relación entre la integridad de los generadores cerebrales del ritmo alfa y el deterioro de la conectividad funcional EEG en personas mayores con DCLa

Dado que las oscilaciones EEG son el resultado de la suma de los potenciales postsinápticos excitadores e inhibidores derivados de la actividad sináptica de las neuronas piramidales de la corteza cerebral (Lopes da Silva & Van Rotterdam, 1993), las disfunciones sinápticas corticales causadas por la concentración de A β (soluble o en agregados) en los individuos con DCLa deberían producir alteraciones de la sincronía de fase EEG entre regiones corticales distantes. Esta hipótesis ha sido confirmada en diferentes estudios previos que han evaluado las propiedades electrofisiológicas del ritmo alfa en personas mayores con DCLa (Babiloni *et al.*, 2006a; Cantero *et al.*, 2009), mostrándose además que los cambios en las propiedades electrofisiológicas de este ritmo cerebral son capaces de predecir la progresión del deterioro cognitivo (Babiloni *et al.*, 2014) y la estabilidad temporal del diagnóstico de DCLa (Babiloni *et al.*, 2011). Sin embargo, son escasos los estudios que han tratado de evaluar la relación entre las características de los ritmos cerebrales y los niveles de atrofia cortical en sujetos con DCLa (Babiloni *et al.*, 2006b; Babiloni *et al.*, 2013). Nuestro trabajo da un paso más en esta dirección, evaluando la relación entre la disminución de conectividad funcional EEG en el estado de

reposo cerebral y la integridad anátomo-funcional de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa.

En este sentido, los resultados del presente trabajo muestran que la integridad anatómica y funcional del tálamo y del precúneo está significativamente afectada en los sujetos con DCLa (González-Escamilla *et al.*, en prensa_b). Como ya se ha mencionado anteriormente, ambas regiones constituyen parte de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa humano (Cantero *et al.*, 2009). Evidencias convergentes han puesto de manifiesto la compleja relación que existe entre la corteza y el tálamo durante la generación del ritmo alfa. Por ejemplo, estudios previos han observado que el aumento del consumo de glucosa del tálamo se acompaña de un incremento de la amplitud de las oscilaciones alfa registradas en regiones parieto-occipitales (Goldman *et al.*, 2002; Schreckenberger *et al.*, 2004; Feige *et al.*, 2005; De Munck *et al.*, 2007). Estos resultados se ven igualmente apoyados por evidencias que muestran que las regiones corticales y talámicas muestran una alta coherencia durante la generación de las oscilaciones alfa (Lopes da Silva *et al.*, 1973). Por lo tanto, la disminución bilateral del volumen del tálamo que mostró nuestro grupo con DCLa, probablemente debida a la reducción de la arborización dendrítica y/o a la muerte de neuronas tálamo-corticales, podría ser una de las causas de la disminución de los niveles de conectividad funcional del ritmo alfa entre regiones corticales anteriores y posteriores en estas personas. Esta hipótesis encuentra soporte experimental adicional en otros estudios que han mostrado la existencia de agregados de A β y ovillos neurofibrilares en el tálamo de pacientes con EA (Rudelli *et al.*, 1984; Masliah *et al.*, 1989; Braak & Braak, 1991), una reducción significativa del volumen del tálamo (Karas *et al.*, 2004) asociada con el deterioro cognitivo (de Jong *et al.*, 2008), y alteraciones de los patrones de conectividad funcional entre el tálamo y el precúneo en personas mayores con DCLa (Cantero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013).

En contra de lo esperado, ni el volumen del tálamo ni el hipometabolismo del precúneo correlacionaron con el deterioro de la conectividad funcional EEG en el grupo de DCLa. Paradójicamente, esta relación únicamente fue significativa en el grupo de CN (González-

Escamilla *et al.*, en prensa_b). La disminución de sinapsis asociada a los procesos de envejecimiento normal podría ser la responsable de esta relación, mientras que las disfunciones sinápticas derivadas de las lesiones de la EA podrían ser la causa de esta ausencia de relación entre la pérdida de integridad de los generadores del ritmo alfa y el deterioro de la conectividad funcional EEG en el grupo con DCLa.

6.3. El deterioro de la conectividad funcional EEG difiere entre DCLa portadores y no portadores del genotipo ApoE $\epsilon 4$

La presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E se ha asociado con una mayor prevalencia de enfermedad de pequeño vaso, un mayor número de microinfartos de los núcleos profundos, una mayor densidad de placas seniles, y angiopatía amiloide en cerebros de pacientes con EA (Yip *et al.*, 2005). El genotipo ApoE4 $\epsilon 4$, además de ser el principal factor de riesgo genético en la EA de comienzo tardío (Corder *et al.*, 1993), aparece con mayor frecuencia en personas mayores con DCL (Boyle *et al.*, 2010) y con DCLa (Pa *et al.*, 2009) que en CN. De hecho, las personas con DCL y/o DCLa que muestran este genotipo presentan una mayor atrofia del hipocampo (Manning *et al.*, 2014), más atrofia en regiones laterales del lóbulo temporal (Goñi *et al.*, 2013), más alteraciones de la conectividad funcional de regiones laterales del lóbulo temporal y una mayor incapacidad para reclutar mecanismos compensatorios atencionales, perceptivos y semánticos (Prieto del Val *et al.*, en revisión) que se asocian con un deterioro de la memoria más acentuado (Farlow *et al.*, 2004; Atienza *et al.*, 2011) y un mayor riesgo de desarrollar EA en comparación con los DCL que no muestran este genotipo (Liu *et al.*, 2013). Sin embargo, se desconoce si existe alguna relación entre la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen ApoE en sujetos con DCLa y el deterioro de la conectividad funcional EEG en el estado de reposo cerebral.

En el presente estudio hemos encontrado un mayor deterioro de la conectividad funcional EEG en los individuos DCLa $\epsilon 4^+$ que en los $\epsilon 4^-$ (González-Escamilla *et al.*, en prensa_a) Más específicamente, los portadores de este gen mostraron un deterioro más acentuado de la

conectividad inter-hemisférica entre regiones del lóbulo frontal que los no portadores. De hecho, los niveles de ChAT están reducidos en la corteza frontal de pacientes con EA $\epsilon 4^+$ (Soininen *et al.*, 1995). Además, las conexiones frontales transcallosas de personas sanas de un amplio rango de edad portadores del alelo $\epsilon 4$ se encuentran significativamente dañadas (Filippini *et al.*, 2009). Por lo tanto, todos estos resultados apuntan a que la anatomía funcional del lóbulo frontal podría ser más vulnerable en las personas mayores con DCLa que presentan el genotipo ApoE $\epsilon 4$.

Los mecanismos mediante los que el genotipo ApoE $\epsilon 4$ ejerce su efecto sobre los patrones de conectividad funcional EEG no se conocen bien. Experimentos *in vitro* en ratones que expresan el gen humano ApoE $\epsilon 4$ han mostrado que un incremento en la expresión de este alelo se acompaña de una disminución de las fibras musgosas de las células granulares del hipocampo (Teter *et al.*, 2002), lo cual, probablemente, acabe afectando a los circuitos sinápticos locales y a los patrones de conectividad funcional con otras regiones distantes. Además, otros estudios han mostrado que el alelo $\epsilon 4$ afecta al procesamiento de la proteína precursora de amiloide, conduciendo a una sobreproducción del péptido A β en cultivos de neuronas (Ye *et al.*, 2005). Por otra parte, experimentos *in vivo* con ratones envejecidos avalan la relación entre el alelo $\epsilon 4$ y el incremento de los depósitos de A β en comparación con otras isoformas del gen ApoE (Holtzman *et al.*, 2000). Paradójicamente, nuestro estudio no ha encontrado una relación significativa entre el deterioro de la conectividad funcional EEG y los niveles de A β en sangre en los sujetos con DCLa. Este resultado negativo podría atribuirse al tamaño reducido de la muestra empleada, a la heterogeneidad intrínseca de los sujetos con DCLa, y/o a la variabilidad de las mediciones de A β en plasma. Por lo tanto, esta cuestión debería evaluarse de forma más controlada en futuros experimentos.

6.4. Relación entre los niveles de A β en sangre y el deterioro de la conectividad funcional EEG en personas mayores con DCLa

La acumulación del péptido A β_{1-42} es una de las principales causas de la EA, dadas sus propiedades de hidrofobicidad que favorecen la agregación, lo cual podría conducir a la muerte de grandes grupos de neuronas y a la aparición de microinfartos cerebrales (Pike *et al.*, 1991; Gandy, 2005). Aunque en condiciones normales el péptido A β_{1-42} circula por el líquido intersticial del cerebro, LCE, y por la sangre, sus niveles cerebrales aumentan cuando se alteran sus mecanismos de producción y aclaramiento, facilitando la agregación y potenciando sus consecuencias nocivas en el ambiente cerebral. En la EA, la agregación de A β se produce desde fases muy incipientes en regiones de la neocorteza y del sistema límbico (Morris & Price, 2001; Markesbery *et al.*, 2006), favoreciendo la aparición de los primeros síntomas cognitivos subclínicos de la EA.

La búsqueda de marcadores de A β en sangre periférica en las fases prodrómicas de la EA ha adquirido gran relevancia en la última década, dada la naturaleza invasiva, los posibles efectos secundarios, y la dificultad para realizar seguimientos de grandes poblaciones de pacientes al emplear muestras de LCE. Desafortunadamente, los resultados derivados de estudios que han empleado marcadores de A β en plasma son especialmente inconsistentes (Sobów *et al.*, 2005; Blasko *et al.*, 2008; Storace *et al.*, 2010; Pesini *et al.*, 2012), probablemente debido a la inestabilidad del péptido A β en plasma (Humpel, 2011), al estado de la agregación (Storace *et al.*, 2010), y a la heterogeneidad de las poblaciones de DCL empleadas. Solo aquellos estudios que han restringido su muestra a sujetos con DCLa han encontrado concentraciones de A β en plasma más elevadas que en CN (Sobów *et al.*, 2005; Storace *et al.*, 2010; Pesini *et al.*, 2012), hecho que hemos podido confirmar en el presente trabajo. Sin embargo, si los niveles elevados de A β en plasma están reflejando o no un proceso patológico relacionado con la EA en nuestro grupo de DCLa, es una especulación que requiere de confirmación experimental más precisa y detallada.

Nuestro estudio mostró que el incremento de los niveles de A β_{1-42} a nivel basal está relacionado con una disminución de los niveles de conectividad funcional EEG de las regiones parieto-occipitales en el grupo de CN, pero no en el grupo con DCLa. Este resultado sugiere que las concentraciones de A β_{1-42} en plasma podrían ser un mejor indicador de los cambios de conectividad funcional EEG asociados al envejecimiento normal que de aquellos asociados al DCLa, y por lo tanto, podrían ser potencialmente utilizados como un marcador del deterioro de la integridad cortical asociado al propio fenómeno del envejecimiento. Una explicación alternativa sería que las personas mayores normales que muestran niveles más altos de A β_{1-42} pudieran presentar un deterioro cognitivo más rápido que aquellos que muestran niveles más bajos de este péptido. Esta hipótesis viene avalada experimentalmente por otros estudios que muestran que la carga cerebral de A β , evaluada con PET-PiB, está asociada a un rendimiento cognitivo más bajo (Wirth *et al.*, 2013) y a una reducción del espesor cortical en personas mayores sanas (Becker *et al.*, 2011). Sin embargo, no parece que esta explicación pueda extrapolarse a nuestro estudio, ya que solo los individuos con DCLa que desarrollaron la EA en los dos años siguientes mostraron una disminución significativa de los niveles de A β_{1-42} . Además, tampoco podríamos confirmar experimentalmente nuestra explicación a este fenómeno, ya que los CN no formaron parte del seguimiento que realizamos.

Por otra parte, estudios recientes han mostrado una relación significativa entre la presencia de quejas subjetivas de memoria y la carga de A β cerebral en personas mayores sanas (Amariglio *et al.*, 2012), afectando fundamentalmente a regiones de la corteza prefrontal, corteza cingulada y precúneo (Perrotin *et al.*, 2012). Las quejas subjetivas de memoria podrían contribuir a esclarecer la relación entre el incremento de los niveles de A β_{1-42} en sangre y la disminución de los niveles de conectividad parieto-occipital mostrada por los CN del presente trabajo. Desafortunadamente, nuestro estudio no evaluó sistemáticamente la presencia de quejas subjetivas de memoria en CN (esto se hizo exclusivamente en los sujetos con DCLa, ver apartado 4.1 de la sección Materiales y Métodos) y, por lo tanto, no podemos descartar esta hipótesis que necesita ser clarificada en futuros estudios.

6.5. Relación entre los niveles de lípidos en sangre y el deterioro de la conectividad funcional EEG en personas mayores con DCLa

El cerebro es el órgano que acumula la mayor cantidad de colesterol (25% del total del organismo). La membrana de las células nerviosas está compuesta por una doble capa de moléculas de colesterol, que desempeñan un papel importante en la plasticidad sináptica y también participan en el tráfico de membrana y en la transducción de señales (Dietschy & Turley, 2001; Mouritsen & Zuckermann, 2004). La muerte neuronal asociada al envejecimiento produce una acumulación de colesterol libre en el cerebro, que es parcialmente integrado en los astrocitos. El exceso de colesterol en el espacio extracelular es mediado por ABCA1, una proteína de transporte de membrana que facilita la formación del complejo ApoE-colesterol-fosfolípidos y que requiere de la hidrólisis de trifosfato de adenosina (*adenosin trifosfato*, ATP, siglas en inglés) para su correcto funcionamiento (Hirsch-Reinshagen *et al.*, 2004). Los mecanismos que regulan la homeostasis de lípidos pueden verse afectados por el propio fenómeno del envejecimiento, pero también por la dieta y por determinadas mutaciones genéticas, acelerando procesos patológicos relacionados con diferentes enfermedades neurodegenerativas como la EA, enfermedad de Parkinson, Niemann-Pick o Huntington (Liu *et al.*, 2010).

Diferentes estudios han propuesto que la EA está relacionada con alteraciones en los mecanismos que regulan la homeostasis del colesterol (*e.g.*, Roher *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 1999). En esta línea, diversos trabajos han mostrado que las concentraciones elevadas de colesterol en sangre son un factor de riesgo para el desarrollo de la EA (Pappolla *et al.*, 2003), dando soporte experimental a la hipótesis del papel del colesterol como promotor de la amiloidogénesis (Bodovitz & Klein, 1996; Simons *et al.*, 1998; Refolo *et al.*, 2000; Grösgen *et al.*, 2010). Además, las alteraciones del metabolismo del colesterol y su acumulación contribuyen a la fosforilación anormal de la proteína tau (Mathew *et al.*, 2011), dado que los niveles elevados de colesterol interfieren en la actividad de las principales quinasas y fosfatasa responsables del estado de fosforilación de dicha proteína (Rahman *et al.*, 2005).

Nuestros resultados mostraron que los niveles de APOB, un marcador de lipoproteínas circulantes con potencial aterogénico (Barter *et al.*, 2006), son significativamente más elevados en las personas mayores con DCLa que en CN, confirmando hallazgos obtenidos en pacientes con EA (Caramelli *et al.*, 1999). Estudios previos también han revelado que los niveles elevados de APOB (Motta *et al.*, 2009) y de colesterol LDL (Lamarche *et al.*, 1996) se acompañan de una mayor cantidad de alteraciones aterogénicas. Además, los factores de riesgo cardiovascular predicen una conversión más rápida a EA en sujetos con DCL (Tabet *et al.*, 2009; Peters & Beckett, 2009). Pese a que en el presente trabajo los niveles de triglicéridos no difirieron significativamente entre CN y DCLa, el incremento de los niveles de triglicéridos sí estuvo relacionado con una disminución bilateral de volumen del precúneo en el grupo con DCLa (González-Escamilla *et al.*, en prensa_b). Aunque algunos estudios han mostrado asociaciones entre la concentración de triglicéridos y los niveles elevados de A β en modelos animales de EA (Burgess *et al.*, 2006), los mecanismos moleculares que subyacen a esta relación se desconocen por el momento.

El fomento de hábitos dirigidos al envejecimiento saludable influye sobre la esperanza de vida de nuestros mayores y tiene importantes consecuencias económicas. En las últimas décadas se han identificado diferentes trayectorias de envejecimiento (envejecimiento óptimo, normal y patológico) y existe una necesidad creciente por determinar aquellos factores que conducen y/o modifican cada una de estas trayectorias. Por ejemplo, los factores que influyen sobre el metabolismo del colesterol, como la dieta o la actividad física, juegan un papel relevante en los procesos de envejecimiento cognitivo y, por lo tanto, son importantes factores de riesgo para el desarrollo de una demencia. Nuestro estudio ha mostrado que el incremento de la conectividad funcional EEG de los sujetos con DCLa está relacionado con los niveles elevados de colesterol HDL, mientras que la disminución de la conectividad funcional inter-hemisférica mostrada por el grupo de CN correlaciona con los niveles elevados de colesterol LDL y colesterol total. Estos resultados revelan, por primera vez, que los niveles de lípidos en sangre se relacionan de forma diferencial con los patrones de acoplamiento de fase oscilatoria del ritmo alfa y con cambios en la integridad anátomo-funcional de los generadores de este ritmo cerebral, en

personas mayores sanas y con DCLa (González-Escamilla *et al.*, en prensa_b). Todas las evidencias apuntan a que la relación entre los cambios del metabolismo de lípidos y la función cognitiva debe ser indirecta, dada la ausencia de efectos positivos de las estatinas sobre el rendimiento cognitivo durante el envejecimiento normal (Benito-León *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2013) y su incapacidad para prevenir la EA (Ancelin *et al.*, 2012; Swiger *et al.*, 2013).

6.6. Relevancia de los diferentes marcadores como predictores de la EA

A pesar de que las personas mayores con DCLa presentan un mayor riesgo de desarrollar EA que los CN (Petersen *et al.*, 2001), no todos los DCLa convierten a EA o empeoran con el tiempo (Ritchie *et al.*, 2001; Palmer *et al.*, 2002). Actualmente, diversas pruebas neuropsicológicas permiten discriminar entre sujetos con DCLa y pacientes con EA leve (Summers & Saunders, 2012), aunque la capacidad diagnóstica de estas pruebas cognitivas difiere ampliamente entre estudios. Algunos de estos trabajos han mostrado que el MMSE es la prueba que presenta mayor fiabilidad para diferenciar entre DCLa y EA leve, mostrando un 93% de sensibilidad y un 96% de especificidad (Wang *et al.*, 2013). Además, otros estudios han encontrado que los DCL que desarrollan EA en los siguientes 3 años muestran una disminución más pronunciada en las puntuaciones del MMSE (Tabert *et al.*, 2006; Hatashita & Yamasaki, 2013) y en las pruebas de memoria inmediata (Ewers *et al.*, 2010; Irish *et al.*, 2011) y demorada (Hatashita & Yamasaki, 2013) en comparación con los DCL que permanecen estables. Nuestro estudio viene a confirmar estos hallazgos en personas mayores con DCLa que dos años más tarde desarrollaron EA, avalando el importante papel que juegan las evaluaciones neuropsicológicas durante las fases prodrómicas de la EA.

En los modelos transgénicos de EA, los niveles de $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-40}$ en plasma y en LCE aumentan con la edad pero disminuyen cuando este péptido comienza a acumularse en el cerebro (Kawarabayashi *et al.*, 2001), lo que probablemente facilite la aparición del deterioro cognitivo que caracteriza a los pacientes de EA (Näslund *et al.*, 2000). En línea con estos

hallazgos, otros estudios han encontrado que el riesgo mostrado por personas mayores sanas de convertir a DCL o a EA está relacionado con los niveles elevados de $A\beta_{1-42}$ a nivel basal (Mayeux *et al.*, 2003; Shupf *et al.*, 2008; Blasko *et al.*, 2010), con una disminución del ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ a nivel basal (Graff-Radford *et al.*, 2007) y con una disminución progresiva de la acumulación de $A\beta_{1-42}$ y del ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ en sangre (Graff-Radford *et al.*, 2007; Shupf *et al.*, 2008; Abdullah *et al.*, 2009). Incluso hay evidencias recientes de que la conversión a EA se produce de forma más rápida en los sujetos con DCL que muestran una disminución más acentuada de los niveles de $A\beta_{1-42}$ (Cosentino *et al.*, 2010). En consonancia con estos resultados, nuestro estudio también mostró una disminución significativa de los niveles basales de $A\beta$ en aquellos DCLa que convirtieron a EA transcurridos dos años, quizás como resultado de la agregación de $A\beta$ en el cerebro. Dado que la disminución de los niveles de $A\beta$ en LCE se considera un marcador diagnóstico de la presencia de patología amiloide durante las fases prodrómicas de la EA (Jack *et al.*, 2010; Sperling *et al.*, 2013; Dubois *et al.*, 2014), es posible que el mismo fenómeno ocurra a nivel plasmático aunque solo en aquellos DCL que realmente presenten lesiones neuropatológicas de la EA.

Nuestros resultados también mostraron una disminución progresiva de los niveles de $A\beta_{1-40}$ con el tiempo en el grupo cDCL. Determinados estudios prospectivos que solo incluyeron casos que convirtieron a EA han encontrado que los niveles reducidos de $A\beta_{1-40}$ en plasma predicen la conversión a EA (Sundelöf *et al.*, 2008), aunque otros trabajos no encontraron relaciones significativas entre los niveles de $A\beta_{1-40}$ y la progresión a EA (Schupf *et al.*, 2008; Blennow *et al.*, 2010; Hansson *et al.*, 2010). La inconsistencia de resultados obtenidos en los diferentes estudios impide determinar el papel que juega el péptido $A\beta_{1-40}$ en la EA o cómo interpretar sus cambios durante los años que preceden al diagnóstico clínico de la enfermedad. Aunque ciertamente las placas de $A\beta$ contienen una proporción importante de $A\beta_{1-40}$, diversos estudios han mostrado que este péptido no se une a la placa hasta que la formación principal de la placa compuesta por $A\beta_{1-42}$ no se ha terminado de desarrollar (Blennow *et al.*, 2010; Zetterberg *et al.*, 2010).

El presente trabajo también mostró un aumento en los niveles de triglicéridos en el grupo de cDCL transcurridos dos años, fenómeno que no ocurrió en los ncDCL. Los factores de riesgo cardiovascular, entre los que se encuentran los niveles elevados de triglicéridos, han mostrado ser buenos predictores de la conversión acelerada a EA (Tabet *et al.*, 2009; Peters & Beckett, 2009). Estudios con animales apuntan a que el incremento de los niveles de triglicéridos en plasma correlaciona con una mayor cantidad de agregados de A β , por lo que es posible que las elevadas concentraciones de triglicéridos estén relacionados con los niveles de A β periféricos y, por lo tanto, formen parte de la progresión natural de la EA (Burguess *et al.*, 2006). Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a esta relación continúan siendo una incógnita, y futuros estudios deberán aproximar esta cuestión en detalle.

Los niveles de conectividad funcional inter-hemisférica entre regiones frontales fueron significativamente más bajos en cDCL que en ncDCL a nivel basal, lo que sugiere que las disfunciones sinápticas que afectan a la coordinación inter-hemisférica del lóbulo frontal son más evidentes en sujetos con DCLa que desarrollarán EA en los siguientes años. Estudios previos han mostrado una disminución generalizada de la conectividad funcional del cerebro durante la progresión de la enfermedad (Damoiseaux *et al.*, 2012), con especial mención a la conectividad funcional que afecta al lóbulo frontal (Bai *et al.*, 2011). Más allá de la interpretación de este resultado, nuestro estudio pone de manifiesto que los patrones de conectividad funcional EEG difieren significativamente entre personas mayores con DCLa que desarrollaron EA respecto a los que no lo hicieron transcurridos 2 años. De confirmarse este hallazgo en poblaciones de mayor tamaño, este marcador podría utilizarse, en combinación con otros, para mejorar el diagnóstico precoz de la EA en personas con DCLa.

Finalmente, nuestro estudio mostró un incremento significativo del consumo de glucosa de la corteza visual primaria, uno de los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa, en el grupo cDCL respecto al grupo ncDCL. Contrariamente a lo esperado, un buen número de estudios han mostrado que la corteza estriada presenta una cantidad sustancial de lesiones en pacientes con EA (Rogers & Morrison, 1985; Lewis *et al.*, 1987; Braak *et al.*, 1989; Arnold *et al.*, 1991;

Arriagada *et al.*, 1992; Kuljis & Tikoo, 1997), con una disposición de estas lesiones preferentemente en las capas II, III y V, donde se ubican gran parte de las neuronas piramidales de la corteza visual primaria y los generadores neuroeléctricos del ritmo alfa (Silva *et al.*, 1991; Lopes da Silva & Van Rotterdam, 1993). La corteza visual primaria de los pacientes con EA muestra más ovillos neurofibrilares que agregados de A β , al contrario de lo que ocurre en regiones mesolímbicas (Arnold *et al.*, 1991). Dos posibles interpretaciones podrían darse al incremento de consumo metabólico mostrado por los sujetos cDCL en la corteza occipital. Por una parte, este fenómeno podría deberse a la acumulación de agregados de A β que producen una respuesta de hipersincronización neuronal (Wang *et al.*, 2009), o también a un mecanismo de compensación funcional debido al daño producido en otras regiones cerebrales (Mormino *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

6.7. Limitaciones del estudio

A continuación, se discutirán algunas limitaciones del presente trabajo que deberían ser consideradas en futuros experimentos.

Una de las principales fuentes de variabilidad que presentan los estudios sobre envejecimiento y DCL es el reducido tamaño de la muestra empleada, aspecto que podría conducir a un rechazo erróneo de la hipótesis inicial o a una ausencia de efecto (Eng, 2003; Pourhoseingholi & Baghestani, 2011). Este problema es especialmente evidente en estudios como el nuestro que incluyen una amplia variedad de marcadores (*i.e.*, neuropsicológicos, genéticos, moleculares, bioquímicos, neurofisiológicos, e imagen cerebral estructural y funcional), dado el elevado coste económico que supone repetir la batería completa de marcadores además de la dificultad para mantener a los participantes en el experimento durante los años del seguimiento. El presente trabajo se realizó con una muestra de participantes pequeña (CN=26; DCLa=29) que se redujo aún más cuando los DCLa fueron agrupados en aquellos que desarrollaron EA (cDCL=12) y los que no (ncDCL=11). Por lo tanto, los resultados obtenidos es

estos experimentos deberían confirmarse en estudios con poblaciones más grandes, con el fin de evaluar la fiabilidad de los marcadores utilizados.

La duración del seguimiento realizado a los participantes con DCLa fue de 2 años, intervalo temporal que podría considerarse escaso para evaluar la conversión a EA. Por otra parte, nuestro estudio solo incluyó una medida basal para cada marcador y otra a los dos años, lo que redujo la resolución temporal del análisis longitudinal. El incremento en el número de medidas temporales realizadas a cada participante contribuye a contrarrestar el efecto del escaso tamaño de la muestra, aunque también aumenta en cierta medida la variabilidad de los resultados y la complejidad de los análisis (Vickers, 2003). Los estudios longitudinales deben encontrar un equilibrio entre el número de medidas realizadas a cada sujeto y el número de participantes que se incluyen en el estudio, con el objetivo de disminuir la varianza estadística. Por lo tanto, y para incrementar el valor diagnóstico de los resultados obtenidos en el presente trabajo, sería conveniente realizar un estudio de seguimiento con más medidas en el tiempo (*e.g.*, anuales) y con un intervalo temporal más amplio (*e.g.*, 5 años).

Una limitación adicional del presente estudio es que no se emplearon determinaciones de los niveles de A β /Tau en LCE o de la concentración de A β cerebral con PET de amiloide, contribuyendo esto a la propia heterogeneidad de la muestra empleada, no solo en el grupo de DCLa sino también en el de CN. A pesar de la variabilidad intrínseca de los marcadores de la EA en LCE, son los que mejor podrían estar reflejando el nivel de lesiones cerebrales asociados a la EA. Sin embargo, la naturaleza invasiva de esta técnica (punción lumbar) dificulta su uso en aquellos estudios realizados con personas mayores asintomáticas o con signos muy leves de deterioro cognitivo. Además, aunque la disminución de los niveles de A β ₁₋₄₂ en LCE en personas mayores en alto riesgo de padecer EA es un resultado ampliamente aceptado por la comunidad científica, algunos individuos con este perfil muestran una relación opuesta, o la misma relación pero sin que exista una carga de A β cerebral significativa según se extrae de los estudios con PET-PiB (Fagan, 2014). El PET de amiloide se considera una técnica menos invasiva que la extracción de LCE, aunque los costes del radiofármaco (*i.e.*, PiB,

Florbetaben o Florbetapir) son elevados (alrededor de 1000 €/dosis paciente) y existen ciertos riesgos asociados a la inyección de una sustancia radioactiva. Sin embargo, esta técnica proporciona información sobre la localización cerebral de la carga de A β . Idealmente, nuestro trabajo debería haber incluido al menos uno de estos marcadores, lo que nos hubiera permitido determinar de forma indirecta la presencia de patología de la EA en los participantes del estudio y, de esta forma, disminuir la heterogeneidad de la muestra e incrementar la fiabilidad de nuestros resultados.

Por último, evidencias recientes apuntan a que la presencia de quejas subjetivas de memoria en personas mayores sanas podría interaccionar con los resultados de nuestro estudio, ya que éstas se han relacionado con la carga de A β cerebral (Amariglio *et al.*, 2012). Y de hecho, algunos estudios longitudinales han encontrado una asociación significativa entre la presencia de quejas subjetivas de memoria y el desarrollo posterior de un síndrome de DCL o de la EA (Reisberg *et al.*, 2008; Jessen *et al.*, 2010). Desafortunadamente, nuestro estudio no contempló preguntar a los sujetos del grupo de CN si presentaban quejas subjetivas de memoria, a pesar que las puntuaciones obtenidas en las pruebas neuropsicológicas fueron superiores a la media para su edad. Por lo tanto, la ausencia de evaluación de este fenómeno en nuestros CN impide descartar que las quejas subjetivas de memoria sean parcialmente responsables de las correlaciones entre los niveles elevados de A β_{1-42} y el decremento de los niveles de conectividad funcional EEG mostradas en este grupo. Futuros estudios deberán clarificar la relación entre los patrones de conectividad funcional EEG y los marcadores de A β en sangre periférica, estableciendo una doble categoría de CN en base a la presencia/ausencia de quejas subjetivas de memoria.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El síndrome de DCLa cursa con disminuciones de la conectividad funcional EEG que son especialmente evidentes entre regiones parieto-temporales, aunque también afectan de forma más pronunciada a la comunicación inter-hemisférica entre regiones del lóbulo frontal en personas mayores con DCLa que presentan el genotipo ApoE $\epsilon 4$, o en los DCLa que desarrollan EA transcurridos dos años. Luego es muy posible que la disminución de conectividad funcional frontal suponga un mayor riesgo de desarrollar la EA en personas mayores diagnosticadas con DCLa.
2. Los correlatos anátomo-funcionales de la disminución de conectividad funcional EEG mostrada por el grupo con DCLa no solo incluyen regiones cerebrales afectadas por la patofisiología de la EA, como es el caso del lóbulo parietal y del cuerpo calloso, sino también estructuras cerebrales claves en la generación neuroeléctrica del ritmo alfa, como es el caso del precúneo y el tálamo.
3. El incremento de los niveles de colesterol HDL acompaña al aumento de la conectividad funcional EEG en los sujetos con DCLa, lo cual avala el papel neuroprotector de este tipo de colesterol sobre la integridad de los circuitos funcionales corticales en esta población de personas mayores.
4. Los sujetos con DCLa han mostrado que el incremento de los niveles de triglicéridos se asocia con una disminución del volumen del precúneo, estructura cerebral que además de concentrar una mayor carga de A β durante las fases preclínicas de la EA, es un generador neuroeléctrico del ritmo alfa y, por ende, juega un papel relevante en la conectividad funcional EEG que subyace al estado de reposo cerebral.

5. Las personas mayores con DCLa que progresaron a EA muestran un deterioro más acentuado de la función cognitiva global y de la memoria con el paso del tiempo, aspectos que podrían deberse al aumento progresivo de los depósitos de A β a nivel cerebral, tal como podría inferirse de la disminución de los niveles de A β en sangre observada en los cDCLa transcurridos dos años. Por otra parte, los sujetos con DCLa que convirtieron a EA muestran un deterioro de la conectividad funcional EEG entre regiones frontales más acentuado que aquellos DCLa que permanecieron estables, así como niveles de consumo de glucosa anormalmente altos en regiones occipitales implicadas en la generación del ritmo alfa, hallazgos que podrían deberse al efecto de las lesiones de la EA sobre estas regiones corticales.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah L, Luis C, Paris D, Mouzon B, Ait-Ghezala G, Keegan AP, Wang D, Crawford F, Mullan M (2009). Serum Abeta levels as predictors of conversion to mild cognitive impairment/Alzheimer disease in an ADAPT subcohort. *Mol Med*, 15: 432-437.
- Achard S, Bullmore E (2007). Efficiency and cost of economical brain functional networks. *PLoS Comput Biol*, 3: e17.
- Acosta-Cabronero J, Williams GB, Pereira JM, Pengas G, Nestor PJ (2008). The impact of skull-stripping and radio-frequency bias correction on grey-matter segmentation for voxel-based morphometry. *Neuroimage*, 39: 1654-1665.
- Aertsen AM, Gerstein GL, Habib MK, Palm G (1989). Dynamics of neuronal firing correlation: modulation of "effective connectivity". *J Neurophysiol*, 61: 900-917.
- Aggarwal NT, Wilson RS, Beck TL, Bienias JL, Berry-Kravis E, Bennett DA (2005). The apolipoprotein E4 allele and incident Alzheimer's disease in persons with mild cognitive impairment. *Neurocase*, 11: 3-7.
- Allegri RF, Taragano FE, Krupitzki H, Serrano CM, Dillon C, Sarasola D, Feldman M, Tufró G, Martelli M, Sanchez V (2010). Role of cognitive reserve in progression from mild cognitive impairment to dementia. *Dement Neuropsychol*, 4: 28-34.
- Amariglio RE, Becker JA, Carmasin J, Wadsworth LP, Lorus N, Sullivan C, Maye JE, Gidicsin C, Pepin LC, Sperling RA, *et al.* (2012). Subjective cognitive complaints and amyloid burden in cognitively normal older individuals. *Neuropsychologia*, 50: 2880-2886.
- American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4a, ed.), Washington, DC, American Psychiatric Association.
- Amzica F, Steriade M (2000). Neuronal and glial membrane potentials during sleep and paroxysmal oscillations in the neocortex. *J Neurosci*, 20: 6648-6665.
- Ancelin ML, Carrière I, Barberger-Gateau P, Auriacombe S, Rouaud O, Fourlanos S, Berr C, Dupuy AM, Ritchie K (2012). Lipid lowering agents, cognitive decline, and dementia: the three-city study. *J Alzheimers Dis*, 30: 629-637.
- Andrews-Hanna JR, Snyder AZ, Vincent JL, Lustig C, Head D, Raichle ME, Buckner RL (2007). Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron*, 56: 924-935.
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*, 1: 103-116.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 42: 631-639.
- Ashburner J (2007). A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage*, 38: 95-113.
- Ashburner J, Friston KJ (2005). Unified segmentation. *Neuroimage*, 26: 839-851.
- Atienza M, Atalaia-Silva KC, Gonzalez-Escamilla G, Gil-Neciga E, Suarez-Gonzalez A, Cantero JL (2011). Associative memory deficits in mild cognitive impairment: the role of hippocampal formation. *Neuroimage*, 57: 1331-1342.
- Babiloni C, Ferri R, Moretti DV, Strambi A, Binetti G, Dal Forno G, Ferreri F, Lanuzza B, Bonato C, Nobili F, *et al.* (2004). Abnormal fronto-parietal coupling of brain rhythms in mild Alzheimer's disease: a multicentric EEG study. *Eur J Neurosci*, 19: 2583-2590.

- Babiloni C, Ferri R, Binetti G, Cassarino A, Dal Forno G, Ercolani M, Ferreri F, Frisoni GB, Lanuzza B, Miniussi C, *et al.* (2006a). Fronto-parietal coupling of brain rhythms in mild cognitive impairment: a multicentric EEG study. *Brain Res Bull*, 69: 63-73.
- Babiloni C, Frisoni G, Steriade M, Bresciani L, Binetti G, Del Percio C, Geroldi C, Miniussi C, Nobili F, Rodriguez G, *et al.* (2006b). Frontal white matter volume and delta EEG sources negatively correlate in awake subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Clin Neurophysiol*, 117: 1113-1129.
- Babiloni C, Frisoni GB, Vecchio F, Lizio R, Pievani M, Cristina G, Fracassi C, Vernieri F, Rodriguez G, Nobili F, *et al.* (2011). Stability of clinical condition in mild cognitive impairment is related to cortical sources of alpha rhythms: an electroencephalographic study. *Hum Brain Mapp*, 32: 1916-1931.
- Babiloni C, Carducci F, Lizio R, Vecchio F, Baglieri A, Bernardini S, Cavedo E, Bozzao A, Buttinelli C, Esposito F, *et al.* (2013). Resting state cortical electroencephalographic rhythms are related to gray matter volume in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp*, 34: 1427-1446.
- Babiloni C, Del Percio C, Lizio R, Marzano N, Infarinato F, Soricelli A, Salvatore E, Ferri R, Bonforte C, Tedeschi G, *et al.* (2014). Cortical sources of resting state electroencephalographic alpha rhythms deteriorate across time in subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 35: 130-142.
- Baccalá LA, Sameshima K (2001). Partial directed coherence: a new concept in neural structure determination. *Biol Cybern*, 84: 463-474.
- Bai F, Liao W, Watson DR, Shi Y, Wang Y, Yue C, Teng Y, Wu D, Yuan Y, Jia J, *et al.* (2011). Abnormal whole-brain functional connection in amnesic mild cognitive impairment patients. *Behav Brain Res*, 216: 666-672.
- Bai F, Watson DR, Yu H, Shi Y, Yuan Y, Zhang Z (2009). Abnormal resting-state functional connectivity of posterior cingulate cortex in amnesic type mild cognitive impairment. *Brain Res*, 1302: 167-174.
- Baker JT, Holmes AJ, Masters GA, Yeo BT, Krienen F, Buckner RL, Öngür D (2014). Disruption of cortical association networks in schizophrenia and psychotic bipolar disorder. *JAMA Psychiatry*, 71: 109-118.
- Barnes J, Bartlett JW, van de Pol LA, Loy CT, Scahill RI, Frost C, Thompson P, Fox NC (2009). A meta-analysis of hippocampal atrophy rates in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 30: 1711-1723.
- Barter, P.J., Ballantyne, C.M., Carmena, R., Castro Cabezas, M., Chapman, M.J., Couture, P., de Graaf, J., Durrington, P.N., Faergeman, O., Frohlich, J, *et al.* (2006). Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. *J Intern Med*, 259: 247-258.
- Basser PJ, Mattiello J, Le Bihan D (1994). MR Diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical Journal*, 66: 259-267.
- Becker JA, Hedden T, Carmasin J, Maye J, Rentz DM, Putcha D, Fischl B, Greve DN, Marshall GA, Salloway S, *et al.* (2011). Amyloid- β associated cortical thinning in clinically normal elderly. *Ann Neurol*, 69: 1032-1042.
- Beckmann CF, Smith SM (2004). Probabilistic independent component analysis for functional magnetic resonance imaging. *IEEE Trans Med Imaging*, 23: 137-152.
- Benito-Leon J, Louis ED, Vega S, Bermejo-Pareja F (2010). Statins and cognitive functioning in the elderly: a population-based study. *J Alzheimers Dis*, 21: 95-102.
- Binder JR, Desai RH, Graves WW, Conant LL (2009). Where is the semantic system? A critical review and meta-analysis of 120 functional neuroimaging studies. *Cereb Cortex*, 19: 2767-2796.
- Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Tragl KH, Fischer P (2008). Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging*, 29: 1-11.

- Blasko I, Kemmler G, Jungwirth S, Wichart I, Krampla W, Weissgram S, Jellinger K, Tragl KH, Fischer P (2010). Plasma amyloid beta-42 independently predicts both late-onset depression and Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*, 18: 973-982.
- Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 6: 131-144.
- Bodovitz S, Klein WL (1996). Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 271: 4436-4440.
- Boellaard R (2009). Standards for PET image acquisition and quantitative data analysis. *Nucl Med*, 50: 11S-20S.
- Böhm P, Peña-Casanova J, Aguilar M, Hernandez G, Sol JM, Blesa R, NORMACODEN Group (1998). Clinical validity and utility of the interview for deterioration of daily living in dementia for Spanish-speaking communities. *Int Psychogeriatr*, 10: 261-270.
- Bokde AL, Ewers M, Hampel H (2009). Assessing neuronal networks: understanding Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 89: 125-133.
- Boyle PA, Buchman AS, Wilson RS, Kelly JF, Bennett DA (2010). The APOE epsilon4 allele is associated with incident mild cognitive impairment among community-dwelling older persons. *Neuroepidemiology*, 34: 43-49.
- Braak H, Braak E (1991). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, 1: 213-216.
- Braak H, Braak E, Kalus P (1989). Alzheimer's disease: Areal and laminar pathology in the occipital isocortex. *Acta Neuropathol*, 77: 494-506.
- Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K (2011). Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70: 960-969.
- Brazier M, Casby J (1952). Cross-correlation and autocorrelation studies of electroencephalographic potentials. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 4: 201-211.
- Brier MR, Thomas JB, Snyder AZ, Benzinger TL, Zhang D, Raichle ME, Holtzman DM, Morris JC, Ances BM (2012). Loss of intranetwork and internetwork resting state functional connections with Alzheimer's disease progression. *J Neurosci*, 32: 8890-8899.
- Brun A, Englund E (1986). A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type: a pathoanatomical study. *Ann Neurol*, 19: 253-262.
- Buckner RL, Sepulcre J, Talukdar T, Krienen FM, Liu H, Hedden T, Andrews-Hanna JR, Sperling RA, Johnson KA (2009). Cortical hubs revealed by intrinsic functional connectivity: Mapping, assessment of stability, and relation to Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 29: 1860-1873.
- Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, LaRossa G, Sachs R, Fotenos AF, Sheline YI, Klunk WE, Mathis CA, Morris JC, *et al.* (2005). Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci*, 25: 7709-7717.
- Burgel U, Amunts K, Hoemke L, Mohlberg H, Gilsbach JM, Zilles K (2006). White matter fiber tracts of the human brain: threedimensional mapping at microscopic resolution, topography and intersubject variability. *Neuroimage*, 29: 1092-1105.
- Burgess BL, McIsaac SA, Naus KE, Chan JY, Tansley GH, Yang J, Miao F, Ross CJ, van Eck M, Hayden MR, *et al.* (2006). Elevated plasma triglyceride levels precede amyloid deposition in Alzheimer's disease mouse models with abundant Aβeta in plasma. *Neurobiol Dis*, 24: 114-127.
- Busse A, Angermeyer MC, Riedel-Heller SG (2006). Progression of mild cognitive impairment to dementia: a challenge to current thinking. *Br J Psychiatry*, 189: 399-404.
- Busse A, Bischof J, Riedel-Heller SG, Angermeyer MC (2003). Mild cognitive impairment: prevalence and predictive validity according to current approaches. *Acta Neurol Scand*, 108: 71-81.

- Buzsaki G, Anastassiou CA, Koch C (2012). The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci*, 13: 407-420.
- Cajal SR (1893). Estructura del asta de Ammon. *Anal Soc Esp Hist Nat (Madrid)*, 22: 53-114.
- Cajal SR (1909-1911). Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. *Paris, Maloine*.
- Cajal SR (1933). ¿Neuronismo o reticularismo? Las pruebas objetivas de la unidad anatómica de las células nerviosas. *Arch Neurobiol*, 13: 579-646.
- Calhoun VD, Adali T, Pearlson GD, Pekar JJ (2001). A method for making group inferences from functional MRI data using independent component analysis. *Hum Brain Mapp*, 14: 140-151.
- Canolty RT, Knight RT (2010). The functional role of cross-frequency coupling. *Trends Cogn Sci*, 14: 506-515.
- Cantero JL, Atienza M, Gómez-Herrero G, Cruz-Vadell A, Gil-Néciga E, Rodríguez-Romero R, García-Solís D (2009). Functional integrity of thalamocortical circuits differentiates normal aging from mild cognitive impairment. *Hum Brain Mapp*, 30: 3944-3957.
- Cantero JL, Atienza M, Salas RM (2000). State-modulation of cortico-cortical connections underlying normal EEG alpha variants. *Physiol Behav*, 71: 107-115.
- Cantero JL, Atienza M, Salas RM (2002). Human alpha oscillations in wakefulness, drowsiness period, and REM sleep: different electroencephalographic phenomena within the alpha band. *Neurophysiol Clin*, 32: 54-71.
- Cao L, Schrank BR, Rodriguez S, Benz EG, Moulia TW, Rickenbacher GT, Gomez AC, Levites Y, Edwards SR, Golde TE, *et al.* (2012). A β alters the connectivity of olfactory neurons in the absence of amyloid plaques in vivo. *Nat Commun*, 3: 1009.
- Caramelli P, Nitrini R, Maranhão R, Lourenço AC, Damasceno MC, Vinagre C, Caramelli B (1999). Increased apolipoprotein B serum concentration in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*, 100: 61-63.
- Caspers S, Geyer S, Schleicher A, Mohlberg H, Amunts K, Zilles K (2006). The human inferior parietal lobule: cytoarchitectonic parcellation and interindividual variability. *Neuroimage*, 33: 430-448.
- Cavanna AE, Trimble MR (2006). The precuneus: a review of its functional anatomy and behavioural correlates. *Brain*, 129: 564-583.
- Cha J, Jo HJ, Kim HJ, Seo SW, Kim HS, Yoon U, Park H, Na DL, Lee JM (2013). Functional alteration patterns of default mode networks: comparisons of normal aging, amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci*, 37: 1916-1924.
- Chang L, Jiang CS, Ernst T (2009). Effects of age and sex on brain glutamate and other metabolites. *Magn Reson Imaging*, 27: 142-145.
- Charlton RA, Barrick TR, McIntyre DJ, Shen Y, O'Sullivan M, Howe FA, Clark CA, Morris RG, Markus HS (2006). White matter damage on diffusion tensor imaging correlates with age-related cognitive decline. *Neurology*, 66: 217-222.
- Chen ZJ, He Y, Rosa P, Germann J, Evans AC (2008). Revealing modular architecture of human brain structural networks by using cortical thickness from MRI. *Cereb Cortex*, 18: 2374-2381.
- Chen ZJ, He Y, Rosa-Neto P, Gong G, Evans AC (2011). Age-related alterations in the modular organization of structural cortical network by using cortical thickness from MRI. *Neuroimage*, 56: 235-245.
- Cheng N, Bai L, Steuer E, Belluscio L (2013). Olfactory functions scale with circuit restoration in a rapidly reversible Alzheimer's disease model. *J Neurosci*, 33: 12208-12217.
- Cheng IH, Searce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N, Puoliväli J, Lesné S, Ashe KH, Muchowski PJ, *et al.* (2007). Accelerating amyloid- β fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem*, 282: 23818-23828.

- Chung HW, Chou MC, Chen CY (2011). Principles and limitations of computational algorithms in clinical diffusion tensor MR tractography. *AJNR Am J Neuroradiol*, 32: 3-13.
- Cohen MX, Axmacher N, Lenartz D, Elger CE, Sturm V, Schlaepfer TE (2009). Good vibrations: cross-frequency coupling in the human nucleus accumbens during reward processing. *J Cogn Neurosci*, 21: 875-889.
- Collins D, Neelin P, Peters T, Evans A (1994). Automatic 3D intersubject registration of MR volumetric data in standardized Talairach space. *J Comp Ass Tomogr*, 18: 192-205.
- Cosentino SA, Stern Y, Sokolov E, Scarmeas N, Manly JJ, Tang MX, Schupf N, Mayeux RP (2010). Plasma β -amyloid and cognitive decline. *Arch Neurol*, 67: 1485-1490.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261: 921-923.
- Corder EH, Woodbury MA, Volkman I, Madsen DK, Bogdanovic N, Winblad B (2000). Density profiles of Alzheimer disease regional brain pathology for the huddinge brain bank: pattern recognition emulates and expands upon Braak staging. *Exp Gerontol*, 35: 851-864.
- Counts SE, Nadeem M, Lad SP, Wu J, Mufson EJ (2006). Differential expression of synaptic proteins in the frontal and temporal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 592-601.
- Cox R, van Driel J, de Boer M, Talamini LM (2014). Slow oscillations during sleep coordinate interregional communication in cortical networks. *J Neurosci*, 34: 16890-16901.
- Craik F, Salthouse T (2002). The handbook of aging and cognition. (2^a ed.), Mahwah, Lawrence Erlbaum Associates.
- Crespo-Garcia M, Cantero JL, Pomyalov A, Boccaletti S, Atienza M (2010). Functional neural networks underlying semantic encoding of associative memories. *Neuroimage*, 50: 1258-1270.
- Damoiseaux JS, Beckmann CF, Arigita EJ, Barkhof F, Scheltens P, Stam CJ, Smith SM, Rombouts SA (2008). Reduced resting-state brain activity in the "default network" in normal aging. *Cereb Cortex*, 18: 1856-1864.
- Damoiseaux JS, Greicius MD (2009). Greater than the sum of its parts: a review of studies combining structural connectivity and resting-state functional connectivity. *Brain Struct Funct*, 213: 525-533.
- Damoiseaux JS, Prater KE, Miller BL, Greicius MD (2012). Functional connectivity tracks clinical deterioration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 33: 828.e19-30.
- Damoiseaux JS, Smith SM, Witter MP, Sanz-Arigita EJ, Barkhof F, Scheltens P, Stam CJ, Zarei M, Rombouts SA (2009). White matter tract integrity in aging and Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp*, 30: 1051-1059.
- De Jong LW, Van der Hiele K, Veer IM, Houwing JJ, Westendorp RG, Bollen EL, De Bruin PW, Middelkoop HA, Van Buchem MA, Van der Grond J (2008). Strongly reduced volumes of putamen and thalamus in Alzheimer's disease: an MRI study. *Brain*, 131: 3277-3285.
- De Lacoste MC, White 3rd CL, (1993). The role of cortical connectivity in Alzheimer's disease pathogenesis: a review and model system. *Neurobiol Aging*, 14: 1-16.
- De Munck JC, Gonçalves SI, Huijboom L, Kuijer JP, Pouwels PJ, Heethaar RM, Lopes da Silva FH (2007). The hemodynamic response of the alpha rhythm: An EEG/fMRI study. *Neuroimage*, 35: 1142-1151.
- De Toledo-Morrell L, Goncharova I, Dickerson B, Wilson RS, Bennett DA (2000). From healthy aging to early Alzheimer's disease: in vivo detection of entorhinal cortex atrophy. *Ann N Y Acad Sci*, 911: 240-253.
- Deco G, Jirsa V, McIntosh AR, Sporns O, Kötter R (2009). Key role of coupling, delay, and noise in resting brain fluctuations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 10302-20307.

- DeFelipe J (2010). From the connectome to the synaptome: an epic love story. *Science*, 330: 1198-1201.
- DeKosky ST, Scheff SW (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*, 27: 457-464.
- Delano-Wood L, Stricker NH, Sorg SF, Nation DA, Jak AJ, Woods SP, Libon DJ, Delis DC, Frank LR, Bondi MW (2012). Posterior cingulum white matter disruption and its associations with verbal memory and stroke risk in mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*, 29: 589-603.
- Delbeuck X, Van der Linden M, Collette F (2003). Alzheimer's disease as a disconnection syndrome? *Neuropsychol Rev*, 13: 79-92.
- Delon J (2004). Midway image equalization. *J Math Imaging Vis*, 21: 119-134.
- Denker M, Roux S, Lindén H, Diesmann M, Riehle A, Grün S (2011). The local field potential reflects surplus spike synchrony. *Cereb Cortex*, 21: 2681-2695.
- Di Paola M, Luders E, Di Iulio F, Cherubini A, Passafiume D, Thompson PM, Caltagirone C, Toga AW, Spalletta G (2010a). Callosal atrophy in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: different effects in different stages. *Neuroimage*, 49: 141-149.
- Di Paola M, Di Iulio F, Cherubini A, Blundo C, Casini AR, Sancesario G, Passafiume D, Caltagirone C, Spalletta G (2010b). When, where, and how the corpus callosum changes in MCI and AD: a multimodal MRI study. *Neurology*, 74: 1136-1142.
- Di Paolo G, Kim TW (2011). Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci*, 12: 284-296.
- Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR (2007). Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell*, 6: 275-284.
- Dickerson BC, Bakkour A, Salat DH, Feczko E, Pacheco J, Greve DN, Grodstein F, Wright CI, Blacker D, Rosas HD, *et al.* (2009). The cortical signature of Alzheimer's disease: regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cereb Cortex*, 19: 497-510.
- Dietschy JM, Turley SD (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol*, 12: 105-112.
- Dinstein I, Pierce K, Eyler L, Solso S, Malach R, Behrmann M, Courchesne E (2011). Disrupted neural synchronization in toddlers with autism. *Neuron*, 70: 1218-1225.
- Doesburg SM, Roggeveen AB, Kitajo K, Ward LM (2008). Large-scale gamma-band phase synchronization and selective attention. *Cereb Cortex*, 18: 386-396.
- Driscoll I, Troncoso JC, Rudow G, Sojkova J, Pletnikova O, Zhou Y, Kraut MA, Ferrucci L, Mathis CA, Klunk WE, *et al.* (2012). Correspondence between in vivo (11)C-PiB-PET amyloid imaging and postmortem, region-matched assessment of plaques. *Acta Neuropathol*, 124: 823-831.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, DeKosky ST, Gauthier S, Selkoe D, Bateman R, *et al.* (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol*, 13: 614-29.
- Dummermuth G, Molinari L (1991). Relationships among signals: cross-spectral analysis of the EEG. En: Weitkunat R, editor. Digital biosignal processing (1^a ed.), *Amsterdam, Elsevier*.
- Eng J (2003). Sample size estimation: how many individuals should be studied? *Radiology*, 227: 309-13.
- Ewers M, Walsh C, Trojanowski JQ, Shaw LM, Petersen RC, Jack CR Jr, Feldman HH, Bokde AL, Alexander GE, Scheltens P, *et al.* (2012). Prediction of conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease dementia based upon biomarkers and neuropsychological test performance. *Neurobiol Aging*, 33: 1203-14.
- Fagan AM (2014). CSF biomarkers of Alzheimer's disease: impact on disease concept, diagnosis, and clinical trial design. *Advances in Geriatrics*, 2014: 1-14.

- Fair DA, Cohen AL, Dosenbach NU, Church JA, Miezin FM, Barch DM, Raichle ME, Petersen SE, Schlaggar BL (2008). The maturing architecture of the brain's default network. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 4028-4032.
- Farias ST, Mungas D, Reed BR, Harvey D, DeCarli C (2009). Progression of mild cognitive impairment to dementia in clinic- vs community-based cohorts. *Arch Neurol*, 66: 1151-1157.
- Farlow MR, He Y, Tekin S, Xu J, Lane R, Charles HC (2004). Impact of APOE in mild cognitive impairment. *Neurology*, 63: 1898-1901.
- Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA (1987). MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *Am J Roentgenol*, 149: 351-356.
- Feige B, Scheffler K, Esposito F, Di Salle F, Hennig J, Seifritz E (2005). Cortical and subcortical correlates of electroencephalographic alpha rhythm modulation. *J Neurophysiol*, 93: 2864-2872.
- Fein G, Raz J, Brown FF, Merrin EL (1988). Common reference coherence data are confounded by power and phase effects. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 69: 581-584.
- Filippini N, Zarei M, Beckmann CF, Galluzzi S, Borsci G, Testa C, Bonetti M, Beltramello A, Ghidoni R, Benussi L, *et al.* (2009). Regional atrophy of transcallosal prefrontal connections in cognitively normal APOE epsilon4 carriers. *J Magn Reson Imaging*, 29: 1021-1026.
- Fischer P, Jungwirth S, Zehetmayer S, Weissgram S, Hoenigschnabl S, Gelpi E, Krampla W, Tragl KH (2007). Conversion from subtypes of mild cognitive impairment to Alzheimer dementia. *Neurology*, 68: 288-291.
- Fjell AM, Walhovd KB (2010). Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences. *Rev Neurosci*, 21: 187-221.
- Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, McEvoy LK, Hagler DJ, Holland D, Brewer JB, Dale AM (2009). One-year brain atrophy evident in healthy aging. *J Neurosci*, 29: 15223-15231.
- Fortea J, Sala-Llonch R, Bartres-Faz D, Bosch B, Llado A, Bargallo N, Molinuevo JL, Sanchez-Valle R (2010). Increased cortical thickness and caudate volume precede atrophy in PSEN1 mutation carriers. *J Alzheimers Dis*, 22: 909-922.
- Fox MD, Raichle ME (2007). Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nat Rev Neurosci*, 8: 700-711.
- Fox NC, Schott JM (2004). Imaging cerebral atrophy: normal ageing to Alzheimer's disease. *Lancet*, 363: 392-394.
- Frackowiak RSJ, Friston KJ, Frith CD, Dolan RJ, Price CJ, Zeki S, Ashburner JT, Penny WD (2004). Human brain function (2^a ed.), *San Diego, Academic Press*.
- Franke K, Gaser C (2012). Longitudinal changes in individual BrainAGE in healthy aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *GeroPsych*, 25: 235-245.
- Fries P (2005). A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn Sci*, 9: 474-480.
- Friston KJ (1994). Functional and effective connectivity in neuroimaging: a synthesis. *Hum Brain Mapp*, 2: 56-78.
- Friston KJ (2011). Functional and effective connectivity: a review. *Brain Connect*, 1: 13-36.
- Friston KJ, Frith CD, Liddle PF, Frackowiak RS (1993). Functional connectivity: the principal-component analysis of large (PET) data sets. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13: 5-14.
- Gandy S (2005). The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest*, 115: 1121-1129.

- Ganguli M, Snitz BE, Saxton JA, Chang C-CH, Lee C-W, Vander-Bilt J, Hughes TF, Loewenstein DA, Unverzagt FW, Petersen RC (2011). Outcomes of mild cognitive impairment depend on definition: a population study. *Arch Neurol*, 68: 761-767.
- Geerligs L, Maurits NM, Renken RJ, Lorist MM (2012). Reduced specificity of functional connectivity in the aging brain during task performance. *Hum Brain Mapp*, 35: 319-330.
- Gerstein GL, Perkel DH (1969). Simultaneously recorded trains of action potentials: analysis and functional interpretation. *Science*, 164: 828-830.
- Geslani D, Tierney MC, Herrmann N, Szalai J (2005). Mild cognitive impairment: an operational definition and its conversion rate to Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 19: 383-389.
- Ghosh A, Rho Y, McIntosh AR, Kötter R, Jirsa VK (2008). Cortical network dynamics with time delays reveals functional connectivity in the resting brain. *Cogn Neurodyn*, 2: 115-120.
- Ghribi O (2008). Potential mechanisms linking cholesterol to Alzheimer's disease-like pathology in rabbit brain, hippocampal organotypic slices, and skeletal muscle. *J Alzheimers Dis*, 15: 673-684.
- Giovacchini G, Lerner A, Toczek MT, Fraser C, Ma K, DeMar JC, Herscovitch P, Eckelman WC, Rapoport SI, Carson RE (2004). Brain incorporation of ¹¹C-arachidonic acid, blood volume, and blood flow in healthy aging: a study with partial-volume correction. *J Nucl Med*, 45: 1471-1479.
- Goldman RI, Stern JM, Engel J Jr, Cohen MS (2002). Simultaneous EEG and fMRI of the alpha rhythm. *Neuroreport*, 13: 2487-2492.
- Gonzalez-Escamilla G, Atienza M, Cantero JL (en prensa_a). Impaired cortical oscillatory coupling in mild cognitive impairment: anatomical substrate and ApoE4 effects. *Brain Struct Funct*.
- Gonzalez-Escamilla G, Atienza M, Garcia-Solis D, Cantero JL (en prensa_b). Cerebral and blood correlates of reduced functional connectivity in mild cognitive impairment. *Brain Struct Funct*.
- Goñi J, Cervantes S, Arrondo G, Lamet I, Pastor P, Pastor MA (2013). Selective brain gray matter atrophy associated with APOE e4 and MAPT H1 in subjects with mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*, 33: 1009-1019.
- Grady CL, Protzner AB, Kovacevic N, Strother SC, Afshin-Pour B, Wojtowicz M, Anderson JAE, Churchill N, McIntosh AR (2010). A multivariate analysis of age-related differences in default mode and task-positive networks across multiple cognitive domains. *Cereb Cortex*, 20: 1432-1447.
- Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG (2007). Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 64: 354-362.
- Granger CWJ (1969). Investigating causal relations by econometric models and cross-spectral methods. *Econometrica*, 37: 424-438.
- Gray CM, König P, Engel AK, Singer W (1989). Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature*, 338: 334-337.
- Greicius MD, Krasnow B, Reiss AL, Menon V (2003). Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 253-258.
- Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, Menon V (2004). Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 4637-4642.
- Greicius MD, Supekar K, Menon V, Dougherty RF (2009). Resting-state functional connectivity reflects structural connectivity in the default mode network. *Cereb Cortex*, 19: 72-78.
- Grösgen S, Grimm MO, Friess P, Hartmann T (2010). Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 1801: 966-974.
- Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM (2003). Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, 60: 729-736.

- Gusnard DA, Akbudak E, Shulman GL, Raichle ME (2001). Medial prefrontal cortex and self-referential mental activity: relation to a default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 4259-4264.
- Haass C., Selkoe DJ (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid betapeptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 101-112.
- Hadjipapas A, Casagrande E, Nevado A, Barnes GR, Green G, Holliday IE (2009). Can we observe collective neuronal activity from macroscopic aggregate signals? *Neuroimage*, 44: 1290-1303.
- Hagmann P, Cammoun L, Gigandet X, Meuli R, Honey CJ, Wedeen VJ, Sporns O (2008). Mapping the structural core of human cerebral cortex. *PLoS Biol*, 6: e159.
- Haider B, McCormick DA (2009). Rapid neocortical dynamics: cellular and network mechanisms. *Neuron*, 62: 171-189.
- Hammerle H, Egert U, Mohr A, Nisch W (1994). Extracellular recording in neuronal networks with substrate integrated microelectrode arrays. *Biosens Bioelectron*, 9: 691-696.
- Hempel H, Teipel SJ, Alexander GE, Pogarell O, Rapoport SI, Moller HJ (2002). In vivo imaging of region and cell type specific neocortical neurodegeneration in Alzheimer's disease. Perspectives of MRI derived corpus callosum measurement for mapping disease progression and effects of therapy. Evidence from studies with MRI, EEG and PET. *J Neural Transm*, 109: 837-855.
- Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E, Wallin A, Minthon L, Blennow K (2010). Evaluation of plasma A β (40) and A β (42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 31: 357-67.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, *et al.* (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 41: 1088-1093.
- Hatashita S, Yamasaki H (2013). Diagnosed mild cognitive impairment due to Alzheimer's Disease with PET biomarkers of beta amyloid and neuronal dysfunction. *PLoS ONE*, 8: e66877.
- He Y, Dagher A, Chen Z, Charil A, Zijdenbos A, Worsley K, Evans A (2009). Impaired small-world efficiency in structural cortical networks in multiple sclerosis associated with white matter lesion load. *Brain*, 132: 3366-3379.
- He Y, Evans A (2010). Graph theoretical modeling of brain connectivity. *Curr Opin Neurol*, 23: 341-350.
- Hebb DO (1949). The organization of behavior. New York, Wiley.
- Herculano-Houzel S (2012). The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 Suppl 1: 10661-10668.
- Hirsch-Reinshagen V, Zhou S, Burgess BL, Bernier L, McIsaac SA, Chan JY, Tansley GH, Cohn JS, Hayden MR, Wellington CL (2004). Deficiency of ABCA1 impairs Apolipoprotein E metabolism in brain. *J Biol Chem*, 279: 41197-41207.
- Hof PR, Cox K, Morrison JH (1990). Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J Comp Neurol*, 301: 44-54.
- Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, *et al.* (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 43: 429-435.
- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, *et al.* (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 2892-2897.
- Honey CJ, Sporns O, Cammoun L, Gigandet X, Thiran JP, Meuli R, Hagmann P (2009). Predicting human resting-state functional connectivity from structural connectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 2035-2040.

- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 3228-32233.
- Hughes CP, Berg L, Danzler WL (1982). A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry*, 140: 566-572.
- Hughes SW, Lőrincz M, Cope DW, Blethyn KL, Kekesi KA, Parri HR, Juhasz G, Crunelli V (2004). Synchronized oscillations at alpha and theta frequencies in the lateral geniculate nucleus. *Neuron*, 42: 253-268.
- Iacono D, O'Brien R, Resnick SM, Zonderman AB, Pletnikova O, Rudow G, An Y, West MJ, Crain B, Troncoso JC (2008). Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67: 578-589.
- Ikonomic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, Wu J, Mathis CA, Scheff SW, Mufson EJ, DeKosky ST (2011). Precuneus amyloid burden is associated with reduced cholinergic activity in Alzheimer disease. *Neurology*, 77: 39-47.
- Innocenti GM (1986). General organization of callosal connections in the cerebral cortex. En: Jones EG, Peters A, editores. *Cerebral cortex*, New York, Plenum Press.
- Irish M, Lawlor BA, Coen RF, O'Mara SM (2011). Everyday episodic memory in amnesic mild cognitive impairment: a preliminary investigation. *BMC Neurosci*, 12: 80.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I (2009). Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol*, 118: 53-69.
- Iyo M, Yamasaki T (1993). The detection of age-related decrease of dopamine D1, D2 and serotonin 5-HT2 receptors in living human brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 17: 415-421.
- Jäger F, Hornegger J (2009). Nonrigid registration of joint histograms for intensity standardization in magnetic resonance imaging. *IEEE Trans Med Imaging*, 8: 137-150.
- Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*, 9: 119-128.
- Jasper HH (1958). Report of the committee on methods of clinical examination in electroencephalography. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, 10: 370-371.
- Jensen O, Colgin LL (2007). Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. *Trends Cogn Sci*, 11: 267-269.
- Jeong J, Gore JC, Peterson BS (2001). Mutual information analysis of the EEG in patients with Alzheimer's disease. *Clin Neurophysiol*, 112: 827-835.
- Jessen F, Wiese B, Bachmann C, Eifflaender-Gorfer S, Haller F, Kolsch H, Luck T, Mosch E, van den Bussche H, Wagner M, et al. (2010). Prediction of dementia by subjective memory impairment: effects of severity and temporal association with cognitive impairment. *Arch Gen Psychiatry*, 67: 414-422.
- Johnson JD, Suzuki M, Rugg MD (2013). Recollection, familiarity, and content-sensitivity in lateral parietal cortex: a high-resolution fMRI study. *Front Hum Neurosci*, 7: 219.
- Kaasinen V, Vilkinan H, Hietala J, Nagren K, Helenius H, Olsson H, Farde L, Rinne J (2000). Age-related dopamine D2/D3 receptor loss in extrastriatal regions of the human brain. *Neurobiol Aging*, 21: 683-688.
- Kamiński MJ, Blinowska KJ (1991). A new method of the description of the information flow in the brain structures. *Biol Cybern*, 65: 203-210.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2000). Principles of neural science (4^a ed.), New York, McGraw-Hill.
- Karas GB, Scheltens P, Rombouts SA, Visser PJ, van Schijndel RA, Fox NC, Barkhof F (2004). Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage*, 23: 708-716.

- Katzner S, Nauhaus I, Benucci A, Bonin V, Ringach DL, Carandini M (2009). Local origin of field potentials in visual cortex. *Neuron*, 61: 35-41.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001). Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 21: 372-381.
- Kiebel SJ, Garrido MI, Moran R, Chen CC, Friston KJ (2009). Dynamic causal modeling for EEG and MEG. *Hum Brain Mapp*, 30: 1866-1876.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63: 287-303.
- Kim J, Kim YH, Lee JH (2013). Hippocampus-precuneus functional connectivity as an early sign of Alzheimer's disease: a preliminary study using structural and functional magnetic resonance imaging data. *Brain Res*, 1495: 18-29.
- Klavr O, Genud-Gabai R, Paz R (2013). Functional connectivity between amygdala and cingulate cortex for adaptive aversive learning. *Neuron*, 80: 1290-1300.
- Knobloch M, Mansuy IM (2008). Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 37: 73-82.
- Knowles RB, Wyart C, Buldyrev SV, Cruz L, Urbanc B, Hasselmo ME, Stanley HE, Hyman BT (1999). Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5274-5279.
- Knyazeva MG, Carmeli C, Khadivi A, Ghika J, Meuli R, Frackowiak RS (2013). Evolution of source EEG synchronization in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 34: 694-705.
- Koch MA, Norris DG, Hund-Georgiadis M (2002). An investigation of functional and anatomical connectivity using magnetic resonance imaging. *Neuroimage*, 16: 241-250.
- Koeda T, Knyazeva M, Njokiktjen C, Jonkman EJ, De Sonnevile L, Vildavsky V (1995). The EEG in acallosal children. Coherence values in the resting state: left hemisphere compensatory mechanism? *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 95: 397-407.
- Kourtis N, Tavernarakis N (2011). Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *EMBO J*, 30: 2520-2531.
- Kreiman G, Hung CP, Kraskov A, Quiroga RQ, Poggio T, DiCarlo JJ (2006). Object selectivity of local field potentials and spikes in the macaque inferior temporal cortex. *Neuron*, 49: 433-445.
- Kuljis RO, Tikoo RK (1997). Discontinuous distribution of senile plaques within striate cortex hypercolumns in Alzheimer's disease. *Vision Res*, 37: 3573-91.
- Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J, Varela FJ (1999). Measuring phase synchrony in brain signals. *Hum Brain Mapp*, 8: 194-208.
- Lakatos P, Shah AS, Knuth KH, Ulbert I, Karmos G, Schroeder CE (2005). An oscillatory hierarchy controlling neuronal excitability and stimulus processing in the auditory cortex. *J Neurophysiol*, 94: 1904-1911.
- Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ, Cantin B, Bernard PM, Dagenais GR, Després JP (1996). Apolipoprotein A-I and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five-year follow-up of men in the Québec cardiovascular study. *Circulation*, 94: 273-278.
- Lambert JC, Amouyel P (2011). Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev*, 21: 295-301.
- Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 41: 1094-1099.

- Landman BA, Bogovic JA, Wan H, El Zahraa El Shahaby F, Bazin PL, Prince JL (2012). Resolution of crossing fibers with constrained compressed sensing using diffusion tensor MRI. *Neuroimage*, 59: 2175-2186.
- Le Bihan D, Johansen-Berg H (2012). Diffusion MRI at 25: exploring brain tissue structure and function. *Neuroimage*, 61: 324-341.
- Lemieux L, Daunizeau J, Walker MC (2011). Concepts of connectivity and human epileptic activity. *Front Syst Neurosci*, 5: 12.
- Leuchter AF, Newton TF, Cook IA, Walter DO, Rosenberg-Thompson S, Lachenbruch PA (1992). Changes in brain functional connectivity in Alzheimer-type and multi-infarct dementia. *Brain*, 115: 1543-1561.
- Lewis DA, Campbell MJ, Terry RD, Morrison JH (1987). Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J Neurosci*, 7: 1799-1808.
- Li K, Guo L, Nie J, Li G, Liu T (2009). Review of methods for functional brain connectivity detection using fMRI. *Comput Med Imaging Graph*, 33: 131-139.
- Liang P, Wang Z, Yang Y, Li K (2012). Three subsystems of the inferior parietal cortex are differently affected in mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*, 30: 475-487.
- Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hébert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol*, 156: 445-453.
- Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*, 9: 106-118.
- Liu JP, Tang Y, Zhou S, Toh BH, McLean C, Li H (2010). Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Neurosci*, 43: 33-42.
- Liu Y, Yu C, Zhang X, Liu J, Duan Y, Alexander-Bloch AF, Liu B, Jiang T, Bullmore E (2014). Impaired long distance functional connectivity and weighted network architecture in Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*, 24: 1422-1435.
- Lo CY, He Y, Lin CP (2011). Graph theoretical analysis of human brain structural networks. *Rev Neurosci*, 22: 551-563.
- Lobo A, Escoba V, Exqueria J, Sevar Díaz A (1979). Mini-Examen Cognoscitivo: Un test sencillo, práctico, para detectar alteraciones intelectuales en pacientes psiquiátricos. *Actas Luso Esp Neurol Psiquia Cienc Afines*, 3: 189-202.
- Lopes da Silva F (1991). Neural mechanisms underlying brain waves: from neural membranes to networks. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 79: 81-93.
- Lopes da Silva F, Van Rotterdam A (1993). Biophysical aspects of EEG and magnetoencephalogram generation. En: Niedermeyer E, Lopes da Silva FH, editores. *Electroencephalography: basic principles, clinical applications and related fields* (3ª ed.), Baltimore, Williams and Wilkins.
- Lopes Da Silva FH, Storm Van Leeuwen W (1977). The cortical source of the alpha rhythm. *Neurosci Lett*, 6: 237-241.
- Lopes da Silva FH, van Lierop TH, Schrijer CF, van Leeuwen WS (1973). Organization of thalamic and cortical alpha rhythms: spectra and coherences. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 35: 627-639.
- Maioli F, Coveri M, Pagni P, Chiandetti C, Marchetti C, Ciarrocchi R, Ruggero C, Nativio V, Onesti A, D'Anastasio C, et al. (2007). Conversion of mild cognitive impairment to dementia in elderly subjects: a preliminary study in a memory and cognitive disorder unit. *Arch Gerontol Geriatr*, 44: 233-241.
- Makarenko V, Llinás R (1998). Experimentally determined chaotic phase synchronization in a neuronal system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 15747-15752.

- Manning EN, Barnes J, Cash DM, Bartlett JW, Leung KK, Ourselin S, Fox NC (2014). APOE e4 is associated with disproportionate progressive hippocampal atrophy in AD. *PLoS ONE*, 9: e97608.
- Marcello E, Epis R, Saraceno C, Di Luca M (2012). Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Adv Exp Med Biol*, 970: 573-601.
- Margulies DS, Petrides M (2013). Distinct parietal and temporal connectivity profiles of ventrolateral frontal areas involved in language production. *J Neurosci*, 33: 16846-16852.
- Maris E (2004). Randomization tests for ERP topographies and whole spatiotemporal data matrices. *Psychophysiology*, 41: 142-151.
- Markesbery WR (2010). Neuropathologic alterations in mild cognitive impairment: a review. *J Alzheimers Dis*, 19: 221-228.
- Markesbery WR, Schmitt FA, Kryscio RJ, Davis DG, Smith CD, Wekstein DR (2006). Neuropathologic substrate of mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, 63: 38-46.
- Martini N, Menicucci D, Sebastiani L, Bedini R, Pingitore A, Vanella N, Milanese M, Landini L, Gemignani A (2012). The dynamics of EEG gamma responses to unpleasant visual stimuli: from local activity to functional connectivity. *Neuroimage*, 60: 922-932.
- Martins IJ, Berger T, Sharman MJ, Verdile G, Fuller SJ, Martins RN (2009). Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 111: 1275-1308.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD (1993). Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology*, 43: 192-197.
- Masliah E, Terry R, Buzsaki G (1989). Thalamic nuclei in Alzheimer disease: evidence against the cholinergic hypothesis of plaque formation. *Brain Res*, 493: 241-246.
- Mathew A, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS (2011). Alzheimer's disease: cholesterol a menace? *Brain Res Bull*, 86: 1-12.
- Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD (2003). Plasma A β 40 and A β 42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology*, 61: 1185-1190.
- McGowder D, Riley C, Morrison EY, Gordon L (2011). The role of high-density lipoproteins in reducing the risk of vascular diseases, neurodegenerative disorders, and cancer. *Cholesterol*, 2011: 496925.
- Meier DS, Guttmann CRG (2003). Time-series analysis of MRI intensity patterns in multiple sclerosis. *Neuroimage*, 20: 1193-1209.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH (1983). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*, 214: 170-197.
- Meunier D, Achard S, Morcom A, Bullmore E (2009a). Age-related changes in modular organization of human brain functional networks. *Neuroimage*, 44: 715-723.
- Meunier D, Lambiotte R, Fornito A, Ersche KD, Bullmore ET (2009b). Hierarchical modularity in human brain functional networks. *Front Neuroinform*, 3: 37.
- Mevel K, Chételat G, Eustache F, Desgranges B (2011). The default mode network in healthy aging and Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2011: 535816.
- Mielke MM, Kozauer NA, Chan KC, George M, Toroney J, Zerrate M, Bandeen-Roche K, Wang MC, Vanzijl P, Pekar JJ, et al. (2009). Regionally-specific diffusion tensor imaging in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage*, 46: 47-55.
- Miller S, Dykes D, Polesky H (1988). A simple Salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*, 16: 1215.
- Mishchenko Y, Hu T, Spacek J, Mendenhall J, Harris KM, Chklovskii DB (2010). Ultrastructural analysis of hippocampal neuropil from the connectomics perspective. *Neuron*, 67: 1009-1020.

- Mitra PP (2014). The circuit architecture of whole brains at the mesoscopic scale. *Neuron*, 83: 1273-1283.
- Montembeault M, Joubert S, Doyon J, Carrier J, Gagnon JF, Monchi O, Lungu O, Belleville S, Brambati SM (2012). The impact of aging on gray matter structural covariance networks. *Neuroimage*, 63: 754-759.
- Mori S, Zhang J (2006). Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron*, 51: 527-539.
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y (2002). Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res*, 70: 392-401.
- Mormino EC, Smiljic A, Hayenga AO, Onami SH, Greicius MD, Rabinovici GD, Janabi M, Baker SL, Yen IV, Madison CM, *et al.* (2011). Relationships between beta-amyloid and functional connectivity in different components of the default mode network in aging. *Cereb Cortex*, 21: 2399-2407.
- Morris JC, Price JL (2001). Pathologic correlates of nondemented aging, mild cognitive impairment, and early-stage Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*, 17: 101-118.
- Motta M, Bennati E, Cardillo E, Ferlito L, Passamonte M, Malaguarnera M (2009). The significance of apolipoprotein-B (Apo-B) in the elderly as a predictive factor of cardio-cerebrovascular complications. *Arch Gerontol Geriatr*, 49: 162-164.
- Mouritsen OG, Zuckermann MJ (2004). What's so special about cholesterol? *Lipids*, 39: 1101-1113.
- Mueller SG, Schuff N, Yaffe K, Madison C, Miller B, Weiner MW (2010). Hippocampal atrophy patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp*, 31: 1339-1347.
- Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD (2000). Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*, 283: 1571-1577.
- Norton L, Hutchison RM, Young GB, Lee DH, Sharpe MD, Mirsattari SM (2012). Disruptions of functional connectivity in the default mode network of comatose patients. *Neurology*, 78: 175-181.
- O Scalaidhe SP, Wilson FA, Goldman-Rakic PS (1997). Areal segregation of face-processing neurons in prefrontal cortex. *Science*, 278: 1135-1138.
- O'Sullivan M, Jones DK, Summers PE, Morris RG, Williams SC, Markus HS (2001). Evidence for cortical "disconnection" as a mechanism of age-related cognitive decline. *Neurology*, 57: 632-638.
- Olde Dubbelink KT, Hillebrand A, Stoffers D, Deijen JB, Twisk JW, Stam CJ, Berendse HW (2014). Disrupted brain network topology in Parkinson's disease: a longitudinal magnetoencephalography study. *Brain*, 137: 197-207.
- Pa J, Boxer A, Chao LL, Gazzaley A, Freeman K, Kramer J, Miller BL, Weinwe MW, Neuhaus J, Johnson JK (2009). Clinical-neuroimaging characteristics of dysexecutive mild cognitive impairment. *Ann neurol*, 65: 414-423.
- Palmer K, Wang HX, Bäckman L, Winblad B, Fratiglioni L (2002). Differential evolution of cognitive impairment in nondemented older persons: Results from the Kungsholmen Project. *Am J Psychiatry*, 159: 436-442.
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, *et al.* (2007). Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*, 55: 697-711.
- Palop JJ, Mucke L (2010). Amyloid- β induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci*, 13: 812-818.
- Palva JM, Palva S, Kaila K (2005). Phase synchrony among neuronal oscillations in the human cortex. *J Neurosci*, 25: 3962-3972.
- Panza F, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Pichichero G, Capurso SA, Capurso A, Solfrizzi V (2006). Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain Res Rev*, 51: 275-292.

- Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, Girones X, Henry TL, Matsubara E, Zambon D, *et al.* (2003). Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology*, 61: 199-205.
- Park DC, Reuter-Lorenz P (2009). The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol*, 60: 173-196.
- Pasquini L, Tonch A, Plant C, Zherdin A, Ortner M, Kurz A, Förstl H, Zimmer C, Grimmer T, Wohlschäger A, *et al.* (2014). Intrinsic brain activity of cognitively normal older persons resembles more that of patients both with and at risk for Alzheimer's disease than that of healthy younger persons. *Brain Connect*, 4: 323-336.
- Pennanen C, Kivipelto M, Tuomainen S, Hartikainen P, Hänninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Vanhanen M, Nissinen A, Helkala EL, *et al.* (2004). Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early AD. *Neurobiol Aging*, 25: 303-310.
- Peña-Casanova J, Quiñones-Úbeda S, Gramunt-Fombuena N, Aguilar M, Casas L, Molinuevo JL, Robles A, Rodríguez D, Barquero MS, Antúnez C, *et al.* (2009a). Spanish Multicenter Normative Studies (NEURONORMA Project): Norms for Boston Naming Test and Token Test. *Arch Clin Neuropsychol*, 24: 343-354.
- Peña-Casanova J, Quiñones-Úbeda S, Quintana-Aparicio, Aguilar M, Badenes D, Molinuevo JL, Torner L, Robles A, Barquero MS, Villanueva C, *et al.* (2009b). Spanish Multicenter Normative Studies (NEURONORMA Project): Norms for Verbal Span, Visuospatial Span, Letter and Number Sequencing, Trail Making Test, and Symbol Digit Modalities Test. *Arch Clin Neuropsychol*, 24: 321-341.
- Peña-Casanova J, Gramunt-Fombuena N, Quiñones-Úbeda S, Sánchez-Benavides G, Aguilar M, Badenes D, Molinuevo JL, Robles A, Barquero MS, Payno M, *et al.* (2009c). Spanish Multicenter Normative Studies (NEURONORMA Project): Norms for the Rey-Osterrieth complex figure (copy and memory), and free and cued selective reminding test. *Arch Clin Neuropsychol*, 24: 371-393.
- Peña-Casanova J, Quintana-Aparicio M, Quiñones-Úbeda S, Aguilar M, Molinuevo JL, Serradell M, Robles A, Barquero MS, Villanueva C, Antúnez C, *et al.* (2009d). Spanish Multicenter Normative Studies (NEURONORMA Project): Norms for the Visual Object and Space Perception Battery-Abbreviated, and Judgment of Line Orientation. *Arch Clin Neuropsychol*, 24: 355-370.
- Pereda E, Quiñ Quiroga R, Bhattacharya J (2005). Nonlinear multivariate analysis of neurophysiological signals. *Prog Neurobiol*, 77: 1-37.
- Perrotin A, Mormino EC, Madison CM, Hayenga AO, Jagust WJ (2012). Subjective cognition and amyloid deposition imaging: a Pittsburgh Compound B positron emission tomography study in normal elderly individuals. *Arch Neurol*, 69: 223-229.
- Pesini P, Pérez-Grijalba V, Monleón I, Boada M, Tárraga L, Martínez-Lage P, San-José I, Sarasa M (2012). Reliable measurements of the b-amyloid pool in blood could help in the early diagnosis of AD. *Int J Alzheimers Dis*, 2012: 604141.
- Peters R, Beckett N (2009). Hypertension, dementia, and antihypertensive treatment: implications for the very elderly. *Curr Hypertens Rep*, 11: 277-282.
- Peters A, Sethares C, Luebke JI (2008). Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neuroscience*, 152: 970-981.
- Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B (2001). Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, 58: 1985-1992.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999). Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*, 56: 303-308.
- Pievani M, de Haan W, Wu T, Seeley WW, Frisoni GB (2011). Functional network disruption in the degenerative dementias. *Lancet Neurol*, 10: 829-843.

- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1991). Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures. *Eur J Pharmacol*, 207: 367-368.
- Pinho AL, de Manzano Ö, Fransson P, Eriksson H, Ullén F (2014). Connecting to create: expertise in musical improvisation is associated with increased functional connectivity between premotor and prefrontal areas. *J Neurosci*, 34: 6156-6163.
- Pogarell O, Teipel SJ, Juckel G, Gootjes L, Möller T, Bürger K, Leinsinger G, Möller HJ, Hegerl U, Hampel H (2005). EEG coherence reflects regional corpus callosum area in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 76: 109-111.
- Pons AJ, Cantero JL, Atienza M, Garcia-Ojalvo J (2010). Relating structural and functional anomalous connectivity in the aging brain via neural mass modeling. *Neuroimage*, 52: 848-861.
- Pourhoseingholi MA, Baghestani AR (2011). When calculation of minimum sample size is not justified: when sample size calculation is not justified. *Hepat Mon*, 11: 208-209.
- Price JL, Morris JC (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 45: 358-368.
- Prieto del Val L, Cantero JL, Atienza M (en revisión). APOE ϵ 4 constrains engagement of encoding-related compensatory networks in amnesic mild cognitive impairment.
- Putnam MC, Steven MS, Doron KW, Riggall AC, Gazzaniga MS (2010). Cortical projection topography of the human splenium: hemispheric asymmetry and individual differences. *J Cogn Neurosci*, 22: 1662-1669.
- Qi Z, Wu X, Wang Z, Zhang N, Dong H, Yao L, Li K (2010). Impairment and compensation coexist in amnesic MCI default mode network. *Neuroimage*, 50: 48-55.
- Rahman A, Akterin S, Flores-Morales A, Crisby M, Kivipelto M, Schultzberg M, Cedazo-Mínguez A (2005). High cholesterol diet induces tau hyperphosphorylation in apolipoprotein E deficient mice. *FEBS Lett*, 579: 6411-6416.
- Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, Powers WJ, Gusnard DA, Shulman GL (2001). A default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 676-682.
- Raz N (2005). The aging brain observed *in vivo*: Differential changes and their modifiers. En: Cabeza R, Nyberg L, Park DC, editors. Cognitive neuroscience of aging: linking cognitive and cerebral aging, New York, Oxford University Press.
- Raz N, Rodrigue KM (2006). Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci biobehav Rev*, 30: 730-748.
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis*, 7: 321-331.
- Reid AT, Evans AC (2013). Structural networks in Alzheimer's disease. *Eur Neuropsychopharmacol*, 23: 63-77.
- Reisberg B, Pritchep L, Mosconi L, John ER, Glodzik-Sobanska L, Boksay I, Monteiro I, Torossian C, Vedvyas A, Ashraf N, *et al.* (2008). The pre-mild cognitive impairment, subjective cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 4: S98-S108.
- Reuter M, Schmansky NJ, Rosas HD, Fischl B (2012). Within-subject template estimation for unbiased longitudinal image analysis. *Neuroimage*, 61: 1402-1418.
- Richardson K, Schoen M, French B, Umscheid CA, Mitchell MD, Arnold SE, Heidenreich PA, Rader DJ, deGoma EM (2013). Statins and cognitive function: a systematic review. *Ann Intern Med*, 159: 688-697.
- Ritchie K, Artero S, Touchon J (2001). Classification criteria for mild cognitive impairment: a population-based validation study. *Neurology*, 56: 37-42.

- Riudavets MA, Iacono D, Resnick SM, O'Brien R, Zonderman AB, Martin LJ, Rudow G, Pletnikova O, Troncoso JC (2007). Resistance to Alzheimer's pathology is associated with nuclear hypertrophy in neurons. *Neurobiol Aging*, 28: 1484-1492.
- Rodrigue KM, Raz N (2004). Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. *J Neurosci*, 24: 956-963.
- Rogaeva E, Kawarai T, George-Hyslop PS (2006). Genetic complexity of Alzheimer's disease: successes and challenges. *J Alzheimers Dis*, 9: 381-387.
- Rogers J, Morrison JH (1985). Quantitative morphology and regional and laminar distributions of senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 5: 2801-2808.
- Roher AE, Kuo YM, Kokjohn KM, Emmerling MR, Gracon S (1999). Amyloid and lipids in the pathology of Alzheimer disease. *Amyloid*, 6: 136-145.
- Romero-Garcia R, Atienza M, Cantero JL (2014). Predictors of coupling between structural and functional cortical networks in normal aging. *Hum Brain Mapp*, 35: 2724-2740.
- Rowe CC, Ng S, Ackermann U, Gong SJ, Pike K, Savage G, Cowie TF, Dickinson KL, Maruff P, Darby D, et al. (2007). Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology*, 68: 1718-1725.
- Rudelli RD, Ambler MW, Wisniewski HM (1984). Morphology and distribution of Alzheimer neuritic (senile) and amyloid plaques in striatum and diencephalon. *Acta Neuropathol*, 64: 273-281.
- Rubinov M, Sporns O (2010). Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. *Neuroimage*, 52: 1059-1069.
- Sabbagh MN, Shah F, Reid RT, Sue L, Connor DJ, Peterson LK, Beach TG (2006). Pathologic and nicotinic receptor binding differences between mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and normal aging. *Arch Neurol*, 63: 1771-1776.
- Sakkalis V (2011). Review of advanced techniques for the estimation of brain connectivity measured with EEG/MEG. *Comput Biol Med*, 41: 1110-1117.
- Salimpoor VN, van den Bosch I, Kovacevic N, McIntosh AR, Dagher A, Zatorre RJ (2013). Interactions between the nucleus accumbens and auditory cortices predict music reward value. *Science*, 340: 216-219.
- Salthouse TA, Atkinson TM, Berish DE (2003). Executive functioning as a potential mediator of age-related cognitive decline in normal adults. *J Exp Psychol Gen*, 132: 566-594.
- Salvador R, Martínez A, Pomarol-Clotet E, Sarró S, Suckling J, Bullmore E (2007). Frequency based mutual information measures between clusters of brain regions in functional magnetic resonance imaging. *Neuroimage*, 35: 83-88.
- Sanabria-Diaz G, Melie-Garcia L, Iturria-Medina Y, Aleman-Gomez Y, Hernandez-Gonzalez G, Valdés-Urrutia L, Galán L, Valdés-Sosa P (2010). Surface area and cortical thickness descriptors reveal different attributes of the structural human brain networks. *Neuroimage*, 50: 1497-1510.
- Santamaria J, Chiappa KH (1987). The EEG of drowsiness. *New York, Demos Medical Publishing*.
- Santos SF, Pierrot N, Octave JN (2010). Network excitability dysfunction in Alzheimer's disease: insights from in vitro and in vivo models. *Rev Neurosci*, 21: 153-171.
- Sanz-Arigita EJ, Schoonheim MM, Damoiseaux JS, Rombouts SA, Maris E, Barkhof F, Scheltens P, Stam CJ (2010). Loss of 'small-world' networks in Alzheimer's disease: graph analysis of fMRI resting-state functional connectivity. *PLoS One*, 5: e13788.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ (2006). Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 27: 1372-1384.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*, 68: 1501-1508.

- Scheperjans F, Hermann K, Eickhoff SB, Amunts K, Schleicher A, Zilles K (2008). Observer-independent cytoarchitectonic mapping of the human superior parietal cortex. *Cereb Cortex*, 18: 846-867.
- Schiff SJ (2005). Dangerous phase. *Neuroinformatics*, 3: 315-318.
- Schmidtke K, Hermeneit S (2008). High rate of conversion to Alzheimer's disease in a cohort of amnesic MCI patients. *Int Psychogeriatr*, 20: 96-108.
- Schreckenberger M, Lange-Asschenfeldt C, Lochmann M, Mann K, Siessmeier T, Buchholz HG, Bartenstein P, Gründer G (2004). The thalamus as the generator and modulator of EEG alpha rhythm: a combined PET/EEG study with lorazepam challenge in humans. *Neuroimage*, 22: 637-644.
- Schreiber T (2000). Measuring information transfer. *Phys Rev Lett*, 85: 461.
- Schnitzler A, Gross J (2005). Functional connectivity analysis in magnetoencephalography. *Int Rev Neurobiol*, 68: 173-195.
- Schupf N, Tang MX, Fukuyama H, Manly J, Andrews H, Mehta P, Ravetch J, Mayeux R (2008). Peripheral Aβeta subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 14052-14057.
- Seeley WW, Crawford RK, Zhou J, Miller BL, Greicius MD (2009). Neurodegenerative diseases target large-scale human brain networks. *Neuron*, 62: 42-52.
- Segonne F, Dale AM, Busa E, Glessner M, Salat D, Hahn HK, Fischl B (2004). A hybrid approach to the skull stripping problem in MRI. *Neuroimage*, 22: 1060-1075.
- Selkoe DJ (2008). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*, 192: 106-113.
- Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, Bis JC, Smith AV, Carassquillo MM, Lambert JC, *et al.* (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*, 303: 1832-1840.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, *et al.* (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*, 14: 837-842.
- Shannon CE (1948). A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 27: 379-423.
- Shobab LA, Hsiung GY, Feldman HH (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 4: 841-852.
- Silva LR, Amitai Y, Connors BW (1991). Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science*, 251: 432-435.
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 6460-6464.
- Sivanesan S, Tan A, Rajadas J (2013). Pathogenesis of Aβeta oligomers in synaptic failure. *Curr Alzheimer Res*, 10: 316-323.
- Smit DJ, Boersma M, Schnack HG, Micheloyannis S, Boomsma DI, Hulshoff Pol HE, Stam CJ, de Geus EJ (2012). The brain matures with stronger functional connectivity and decreased randomness of its network. *PLoS One*, 7: e36896.
- Smith SM, Fox PT, Miller KL, Glahn DC, Fox PM, Mackay CE, Filippini N, Watkins KE, Toro R, Laird AR, *et al.* (2009). Correspondence of the brain's functional architecture during activation and rest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 13040-13045.
- Sobów T, Flirski M, Kłoszewska I, Liberski PP (2005). Plasma levels of alpha beta peptides are altered in amnesic mild cognitive impairment but not in sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp*, 65: 117-124.

- Soininen H, Kosunen O, Helisalmi S, Mannermaa A, Paljärvi L, Talasniemi S, Ryyänänen M, Riekkinen P (1995). A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *Neurosci Lett*, 187: 79-82.
- Soret M, Bacharach SL, Buvat I (2007). Partial-volume effect in PET tumor imaging. *J Nucl Med*, 48: 932-945.
- Sorg C, Reidl V, Mühlau M, Calhoun VD, Eichele T, Läer L, Drzezga A, Förstl H, Kurz A, Zimmer C, *et al.* (2007). Selective changes of resting-state networks in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 18760-18765.
- Sotero RC, Trujillo-Barreto NJ, Iturria-Medina Y, Carbonell F, Jimenez JC (2007). Realistically coupled neural mass models can generate EEG rhythms. *Neural Comput*, 19: 478-512
- Sperling RA, Dickerson BC, Pihlajamaki M, Vannini P, LaViolette PS, Vitolo OV, Hedden T, Becker JA, Rentz DM, Selkoe DJ, *et al.* (2010). Functional alterations in memory networks in early Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 12: 27-43.
- Sperling RA, Karlawish J, Johnson KA (2013). Preclinical Alzheimer disease-the challenges ahead. *Nat Rev Neurol*, 9: 54-8.
- Sperling RA, Laviolette P, O'Keefe K, O'Brien J, Rentz D, Pihlajamaki M, Marshall G, Hyman BT, Selkoe DJ, Hedden T, *et al.* (2009). Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron*, 63: 178-188.
- Squire L, Berg D, Bloom F, Lac SD, Gosh A, Spitzer N (2008). Fundamental neuroscience (3^a ed.), *Amsterdam, Elsevier*.
- Stam CJ, Jones BF, Manshanden I, van Cappellen van Walsum AM, Montez T, Verbunt JPA, de Munck JC, van Dijk BW, Berendse HW, Scheltens P (2006). Magnetoencephalographic evaluation of resting-state functional connectivity in Alzheimer's disease. *Neuroimage*, 32: 1335-1344.
- Stam CJ, Nolte G, Daffertshofer A (2007). Phase lag index: assessment of functional connectivity from multichannel EEG and MEG with diminished bias from common sources. *Hum Brain Mapp*, 28: 1178-1193.
- Stoub TR, Rogalski EJ, Leurgans S, Bennett DA, deToledo-Morrell L (2010). Rate of entorhinal and hippocampal atrophy in incipient and mild AD: relation to memory function. *Neurobiol Aging*, 31: 1089-1098.
- Storace D, Cammarata S, Borghi R, Sanguineti R, Giliberto L, Piccini A, Pollero V, Novello C, Caltagirone C, Smith MA, *et al.* (2010). Elevation of beta-amyloid 1-42 autoantibodies in the blood of amnesic patients with mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, 67: 867-872.
- Summers MJ, Saunders NL (2012). Neuropsychological measures predict decline to Alzheimer's dementia from mild cognitive impairment. *Neuropsychology*, 26: 498-508.
- Sundelof J, Giedraitis V, Irizarry MC, Sundstrom J, Ingelsson E, Ronnema E, Arnlov J, Gunnarsson MD, Hyman BT, Basun H, *et al.* (2008). Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer disease and dementia in elderly men: a prospective, population-based cohort study. *Arch Neurol*, 65: 256-263.
- Sundgren PC, Dong Q, Gomez-Hassan D, Mukherji SK, Maly P, Welsh R (2004). Diffusion tensor imaging of the brain: review of clinical applications. *Neuroradiology*, 46: 339-350.
- Swiger KJ, Manalac RJ, Blumenthal RS, Blaha MJ, Martin SS (2013). Statins and cognition: a systematic review and meta-analysis of short- and long-term cognitive effects. *Mayo Clin Proc*, 88: 1213-1221.
- Szewczyk-Krolkowski K, Menke RA, Rolinski M, Duff E, Salimi-Khorshidi G, Filippini N, Zamboni G, Hu MT, Mackay CE (2014). Functional connectivity in the basal ganglia network differentiates PD patients from controls. *Neurology*, 83: 208-214.
- Tabet N, Quinn R, Klugman A (2009). Prevalence and cognitive impact of cerebrovascular findings in Alzheimer's disease: a retrospective, naturalistic study. *Int J Clin Pract*, 63: 338-345.

- Tabert MH, Manly JJ, Liu X, Pelton GH, Rosenblum S, Jacobs M, Zamora D, Goodkind M, Bell K, Stern Y, *et al.* (2006). Neuropsychological prediction of conversion to Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *Arch Gen Psychiatry*, 63: 916-924.
- Takahashi E, Ohki K, Kim DS (2008). Dissociated pathways for successful memory retrieval from the human parietal cortex: anatomical and functional connectivity analyses. *Cereb Cortex*, 18: 1771-1778.
- Talairach J, Tournoux P (1988). Co-planar stereotaxic atlas of the human brain. *New York, Thieme Medical*.
- Tapiola T, Pennanen C, Tapiola M, Tervo S, Kivipelto M, Hanninen T, Pihlajamaki M, Laakso MP, Hallikainen M, Hamalainen A, *et al.* (2008). MRI of hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment: a follow-up study. *Neurobiol Aging*, 29: 31-38.
- Tao H, Guo S, Ge T, Kendrick KM, Xue Z, Liu Z, Feng J (2013). Depression uncouples brain hate circuit. *Mol Psychiatry*, 18: 101-111.
- Teipel SJ, Pogarell O, Meindl T, Dietrich O, Sydykova D, Hunklinger U, Georgii B, Mulert C, Reiser MF, Möller HJ, *et al.* (2009) Regional networks underlying interhemispheric connectivity: an EEG and DTI study in healthy ageing and amnesic mild cognitive impairment. *Hum Brain Mapp*, 30: 2098-2119.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30: 572-580.
- Tervo S, Kivipelto M, Hänninen T, Vanhanen M, Hallikainen M, Mannermaa A, Soininen H (2004). Incidence and risk factors for mild cognitive impairment: a population-based three-year follow-up study of cognitively healthy elderly subjects. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 17: 196-203.
- Teter B, Xu PT, Gilbert JR, Roses AD, Galasko D, Cole GM (2002). Defective neuronal sprouting by human apolipoprotein E4 is a gain-of-negative function. *J Neurosci Res*, 68: 331-336.
- Toga A, Mazziotta J (2002). Brain mapping: the methods (2^a ed.), *London, Elsevier*.
- Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB (2004). Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci*, 7: 1181-1183.
- Tymofiyeva O, Hess CP, Ziv E, Lee PN, Glass HC, Ferriero DM, Barkovich AJ, Xu D (2013). A DTI-based template-free cortical connectome study of brain maturation. *PLoS One*, 8: e63310.
- Valdes-Hernandez PA, Ojeda-Gonzalez A, Martinez-Montes E, Lage-Castellanos A, Virues-Alba T, Valdes-Urrutia L, Valdes-Sosa PA (2010). White matter architecture rather than cortical surface area correlates with the EEG alpha rhythm. *Neuroimage*, 49: 2328-2339.
- van Buuren M, Kroes MC, Wagner IC, Genzel L, Morris RG, Fernández G (2014). Initial investigation of the effects of an experimentally learned schema on spatial associative memory in humans. *J Neurosci*, 34: 16662-16670.
- van den Heuvel MP, Mandl RCW, Kahn RS, Hulshoff Pol HE (2009). Functionally linked resting state networks reflect the underlying structural connectivity architecture of the human brain. *Hum Brain Mapp*, 30: 3127-3141.
- van Elswijk G, Maij F, Schoffelen JM, Overeem S, Stegeman DF, Fries P (2010). Corticospinal beta-band synchronization entails rhythmic gain modulation. *J Neurosci*, 30: 4481-4488.
- Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J (2001). The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat Rev Neurosci*, 2: 229-239.
- Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM (2011). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol*, 10: 241-252.
- Vicente R, Wibral M, Lindner M (2011). Transfer entropy—a model-free measure of effective connectivity for the neurosciences. *J Comput Neurosci*, 30: 45-67.

- Vickers AJ (2003). How many repeated measures in repeated measures designs? Statistical issues for comparative trials. *BMC Med Res Methodol*, 3: 22.
- Vincent L, Soille P (1991). Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, 13: 583-598.
- Vincent JL, Kahn I, Snyder AZ, Raichle ME, Buckner RL (2008). Evidence for a frontoparietal control system revealed by intrinsic functional connectivity. *J Neurophysiol*, 100: 3328-3342.
- von Stein A, Sarnthein J (2000). Different frequencies for different scales of cortical integration: from local gamma to long range alpha/theta synchronization. *Int J Psychophysiol*, 38: 301-313.
- Voytek B, Canolty RT, Shestuyuk A, Crone NE, Parvizi J, Knight RT (2010). Shifts in gamma phase-amplitude coupling frequency from theta to alpha over posterior cortex during visual tasks. *Front Hum Neurosci*, 4: 191.
- Vourkas M, Karakonstantaki E, Simos PG, Tsirka V, Antonakakis M, Vamvoukas M, Stam C, Dimitriadis S, Micheloyannis S (2014). Simple and difficult mathematics in children: a minimum spanning tree EEG network analysis. *Neurosci Lett*, 576: 28-33.
- Wada Y, Nanbu Y, Koshino Y, Yamaguchi N, Hashimoto T (1998). Reduced interhemispheric EEG coherence in Alzheimer disease: analysis during rest and photic stimulation. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 12: 175-181.
- Walsh DM, Selkoe DJA (2007). β oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem*, 101: 1172-1184.
- Wang HM, Yang CM, Kuo WC, Huang CC, Kuo HC (2013). Use of a modified spatial-context memory test to detect amnesic mild cognitive impairment. *PLoS ONE*, 8: e57030.
- Wang JX, Rogers LM, Gross EZ, Ryals AJ, Dokucu ME, Brandstatt KL, Hermiller MS, Voss JL (2014). Targeted enhancement of cortical-hippocampal brain networks and associative memory. *Science*, 345: 1054-1057.
- Wang JZ, Liu F (2008). Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol*, 85: 148-175.
- Wang L, Brier MR, Snyder AZ, Thomas JB, Fagan AM, Xiong C, Benzinger TL, Holtzman DM, Morris JC, Ances BM (2013). Cerebrospinal Fluid A β 42, Phosphorylated Tau181, and Resting-State Functional Connectivity. *JAMA Neurol*, 70: 1242-1248.
- Wang L, Li Y, Metzack P, He Y, Woodward TS (2010). Age-related changes in topological patterns of large-scale brain functional networks during memory encoding and recognition. *Neuroimage*, 50: 862-872.
- Wang L, Zang Y, He Y, Liang M, Zhang X, Tian L, Wu T, Jiang T, Li K (2006). Changes in hippocampal connectivity in the early stages of Alzheimer's disease: evidence from resting state fMRI. *Neuroimage*, 31: 496-504.
- Wang PJ, Saykin AJ, Flashman LA, Wishart HA, Rabin LA, Santulli RB, McHugh TL, MacDonald JW, Mamourian AC (2006). Regionally specific atrophy of the corpus callosum in AD, MCI and cognitive complaints. *Neurobiol Aging*, 27: 1613-1617.
- Wang PN, Liu HC, Lirng JF, Lin KN, Wu ZA (2009). Accelerated hippocampal atrophy rates in stable and progressive amnesic mild cognitive impairment. *Psychiatry Res*, 171: 221-231.
- Wang Y, Chan GL, Holden JE, Dobko T, Mak E, Schulzer M, Huser JM, Snow BJ, Ruth TJ, Calne DB, et al. (1998). Age-dependent decline of dopamine D1 receptors in human brain: a PET study. *Synapse*, 30: 56-61.
- Wang Z, Jia X, Liang P, Qi Z, Yang Y, Zhou W, Li K (2012). Changes in thalamus connectivity in mild cognitive impairment: evidence from resting state fMRI. *Eur J Radiol*, 81: 277-285.
- Watanabe T, Kan S, Koike T, Misaki M, Konishi S, Miyauchi S, Miyahisa Y, Masuda N (2014). Network-dependent modulation of brain activity during sleep. *Neuroimage*, 98: 1-10.

- West RL (1996). An application of prefrontal cortex function theory to cognitive aging. *Psychol Bull*, 120: 272-292.
- Wirth M, Oh H, Mormino EC, Markley C, Landau SM, Jagust WJ (2013). The effect of amyloid β on cognitive decline is modulated by neural integrity in cognitively normal elderly. *Alzheimers Dement*, 9: 687-698.
- Wollmer MA (2010). Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1801: 762-773.
- Womelsdorf T, Schoffelen JM, Oostenveld R, Singer W, Desimone R, Engel AK, Fries P (2007). Modulation of neuronal interactions through neuronal synchronization. *Science*, 316: 1609-1612.
- Wong DF, Wagner HN, Jr, Dannals RF, Links JM, Frost JJ, Ravert HT, Wilson AA, Rosenbaum AE, Gjedde A, Douglass KH (1984). Effects of age on dopamine and serotonin receptors measured by positron tomography in the living human brain. *Science*, 226: 1393-1396.
- Wood WG, Schroeder F, Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U (1999). Recent advances in brain cholesterol dynamics: transport, domains, and Alzheimer's disease. *Lipids*, 34: 225-234.
- Woollett K, Spiers HJ, Maguire EA (2009). Talent in the taxi: a model system for exploring expertise. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364: 1407-1416.
- Wu J, Zhang J, Ding X, Li R, Zhou C (2013). The effects of music on brain functional networks: a network analysis. *Neuroscience*, 250: 49-59.
- Wu K, Taki Y, Sato K, Kinomura S, Goto R, Okada K, Kawashima R, He Y, Evans AC, Fukuda H (2012). Age-related changes in topological organization of structural brain networks in healthy individuals. *Hum Brain Mapp*, 33: 552-568.
- Yap PT, Fan Y, Chen Y, Gilmore JH, Lin W, Shen D (2011). Development trends of white matter connectivity in the first years of life. *PLoS One*, 6: e24678.
- Ye S, Huang Y, Müllendorff K, Dong L, Giedt G, Meng EC, Cohen FE, Kuntz ID, Weisgraber KH, Mahley RW (2005). Apolipoprotein apo E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 18700-18705.
- Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O (1983). Development and validation of a geriatric depression scale: a preliminary report. *J Psychiat Res*, 17: 37-49.
- Yip AG, McKee AC, Green RC, Wells J, Young H, Cupples LA, Farrer LA (2005). APOE, vascular pathology, and the AD brain. *Neurology*, 65: 259-265.
- Ystad M, Eichele T, Lundervold AJ, Lundervold A (2010). Subcortical functional connectivity and verbal episodic memory in healthy elderly--a resting state fMRI study. *Neuroimage*, 52: 379-388.
- Zahs KR, Ashe KH (2013). β -Amyloid oligomers in aging and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, 5: 28.
- Zetterberg H, Blennow K, Hanse E (2010). Amyloid beta and APP as biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 45: 23-29.
- Ziegler G, Dahnke R, Gaser C (2012). Models of the aging brain structure and individual decline. *Front Neuroinform*, 6: 3.
- Zhou B, Liu Y, Zhang Z, An N, Yao H, Wang P, Wang L, Zhang X, Jiang T (2013). Impaired functional connectivity of the thalamus in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a resting-state FMRI study. *Curr Alzheimer Res*, 10: 754-766.
- Zhu W, Wen W, He Y, Xia A, Anstey KJ, Sachdev P (2012). Changing topological patterns in normal aging using large-scale structural networks. *Neurobiol Aging*, 33: 899-913.
- Zhuang L, Wen W, Zhu W, Trollor J, Kochan N, Crawford J, Reppermund S, Brodaty H, Sachdev P (2010). White matter integrity in mild cognitive impairment: a tract-based spatial statistics study. *Neuroimage*, 53: 16-25.

9. ANEXO I. PUBLICACIONES

Impaired cortical oscillatory coupling in mild cognitive impairment: anatomical substrate and ApoE4 effects

Gabriel Gonzalez-Escamilla · Mercedes Atienza ·
Jose L. Cantero

Received: 3 December 2013 / Accepted: 16 March 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Our current knowledge about the anatomical substrate of impaired resting-state cortical oscillatory coupling in mild cognitive impairment is still rudimentary. Here, we show that both resting-state oscillatory coupling and its anatomical correlates clearly distinguish healthy older (HO) adults from individuals with amnesic mild cognitive impairment (aMCI). aMCI showed failures in neural-phase coupling of resting-state electroencephalographic alpha activity mostly evident between fronto-temporal and parietal regions. As oligomers of amyloid-beta ($A\beta$) are linked to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease (AD), we further investigated whether plasma concentrations of these oligomers ($A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$) accounted for impaired patterns of oscillatory coupling in aMCI. Results revealed that decreased plasma $A\beta_{42}$ was associated with augmented coupling of parieto-temporal regions in HO subjects, but no relationship was found in aMCI. Oscillatory coupling of frontal regions was also significantly reduced in aMCI carriers of the $\epsilon 4$ allele of the Apolipoprotein E (ApoE) compared to $\epsilon 4$ noncarriers, although neither neuroanatomical nor plasma $A\beta$ changes accounted for this difference. However, the abnormal pattern of oscillatory coupling in aMCI was negatively related to volume of the angular gyrus, and positively related to volume of the precuneus and the splenium of the corpus callosum. Previous evidence suggests that all these regions are neuropathological targets of AD. The current study

takes that scenario one step further, suggesting that this anatomical damage could be responsible for disrupted cortical oscillatory coupling in aMCI. Together, these data shed light on how the MCI status modifies anatomo-functional relationships underlying coordination of large-scale cortical systems in the resting-state.

Keywords Functional connectivity · Resting-state cortical networks · Anatomical integrity · ApoE4 · Amyloid-beta · Neural-phase coupling · Mild cognitive impairment · Alzheimer's disease

Introduction

Functional circuits in the brain result from electric properties of neurons (Deco et al. 2009; Dhamala et al. 2004) sculpted during early stages of development (Blankenship and Feller 2010) and modified by the organism's experience (Livneh and Mizrahi 2011), aging (Morrison and Baxter 2012), and neurodegenerative disorders such as AD (Arendt 2009). Accumulated evidence has shown that these functional circuits, at large-scale level, are affected in MCI subjects (Cantero et al. 2009a, b; Kramer et al. 2008; Babiloni et al. 2006a; Koenig et al. 2005; Pijenburg et al. 2004), a population at high risk of developing AD (Petersen et al. 1999). Although anomalies in EEG rhythms have been related to changes in cerebral anatomy of aMCI subjects (Babiloni et al. 2006b, 2013), it remains unknown whether abnormal patterns of cortical oscillatory coupling are specifically associated with changes of cortical gray matter (GM) and cerebral white matter (WM), both components required for the emergence of neural synchrony in local circuits and functional coordination in large-scale cortical systems, respectively.

G. Gonzalez-Escamilla · M. Atienza · J. L. Cantero (✉)
Laboratory of Functional Neuroscience, Spanish Network of
Excellence for Research on Neurodegenerative Diseases
(CIBERNED), Pablo de Olavide University, Ctra.
de Utrera Km 1, 41013 Seville, Spain
e-mail: jlcanlor@upo.es

Increased brain levels of soluble A β are linked to synaptic dysfunction and synaptic loss in AD (Mucke et al. 2000; Walsh et al. 2002; Lacor et al. 2007) and could, therefore, account for aberrant connectivity patterns in large-scale cortical networks during disease progression (Brier et al. 2012). However, no study to date has evaluated if A β levels are associated with impaired patterns of cortical oscillatory coupling in subjects with aMCI. Cerebral A β load can be indirectly revealed either by cerebrospinal fluid (CSF) A β_{42} or by positron emission tomography (PET) amyloid imaging, but it remains controversial whether plasma A β levels can also be reflective of brain amyloidosis in MCI-AD patients (Hampel et al. 2011; Koyama et al. 2012; Rissman et al. 2012; Takeda et al. 2010).

Therefore, the present study aims at determining the location and extent of GM/WM changes associated with failures in large-scale cortical oscillatory coupling in aMCI, and whether plasma A β levels modify this anatomical-functional relationship. Neuroimaging findings indicate that GM loss in AD originates in medial and lateral areas of the temporal lobe and later extends to medial parietal regions (Ries et al. 2008; Whitwell et al. 2008; Chetelat et al. 2005), mimicking the scenario of neuropathological lesions observed in post-mortem AD brains (Braak and Braak 1991). Consequently, our first prediction is that impaired functional connectivity patterns should be principally evident in temporo-parietal networks.

Our second hypothesis is that impaired functional connectivity patterns involving parietal regions should be associated with anatomical changes in the precuneus and with higher plasma levels of A β . This hypothesis is based on the prominent role of the precuneus in the generation of the human alpha rhythm (Cantero et al. 2002, 2009a), and on the elevated PiB retention (Pittsburgh Compound B) found in the precuneus of MCI subjects (Driscoll et al. 2012; Rowe et al. 2007).

Finally, abnormalities in temporo-parietal oscillatory coupling are expected to be paralleled by WM changes of the posterior part of the corpus callosum (splenium). This prediction is based on degeneration of the WM pathways connecting medial posterior parietal and medial temporal regions in AD patients (Acosta-Cabronero et al. 2010), and on the massive interhemispheric fiber projections between the splenium and the parieto-occipital cortex (Putnam et al. 2010), regions considered as main cortical generators of the alpha rhythm in higher mammals (Lopes da Silva and Storm Van Leeuwen 1977).

The presence of the ApoE ϵ 4 genotype, the major genetic risk factor for AD (Corder et al. 1993), has been associated with abnormalities of resting-state EEG rhythms in AD patients (Canuet et al. 2012; Lehtovirta et al. 2000;

Jelic et al. 1997; for opposite results, de Waal et al. 2013) and older adults with MCI (Babiloni et al. 2006c). However, as far as we are concerned, no study to date has evaluated the impact of this genetic factor on large-scale cortical oscillatory coupling. To shed light on this issue, we have compared patterns of cortical oscillatory coupling between aMCI ApoE ϵ 4 carriers and noncarriers, and have further assessed whether impaired functional connections associated with this genotype is accounted for specific neuroanatomical changes.

Materials and methods

Subjects

Twenty-nine older adults with aMCI (10 females, mean age 70.1 ± 6.8 years) and 26 HO subjects (15 females, mean age 66.5 ± 4.9 years) participated in the study. Participants were primarily recruited from older people's associations, normal community health screening, and hospital outpatient services. All of them gave informed consent prior to experiments. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Human Research Ethics Committee of the University Pablo de Olavide. Each participant underwent structured, uniform evaluation that included a medical history, neurological examination, and cognitive function testing. Only those who met criteria for HO or aMCI status (see below) were included in the study.

All aMCI subjects showed an idiopathic amnesic disorder with absence of impairment in cognitive areas other than memory as revealed by neuropsychological testing; they further met the diagnostic criteria of aMCI proposed by Petersen et al. (1999): (1) subjective memory complaints corroborated by the informant; (2) objective memory loss confirmed by the Spanish version of the logical memory subtest extracted from the Wechsler Memory Scale, 3rd edition (Wechsler 2004) (scorings 1.5 standard deviations below the age-appropriate mean); (3) global score of 0.5 (questionable dementia) in the clinical dementia rating (CDR) (Hughes et al. 1982); (4) normal independence function, judged both by clinically and by means of the interview for deterioration in daily living activities validated in the Spanish population (Böhm et al. 1998); and (5) no DSM-IV criteria for dementia. The global cognitive status was assessed with the Spanish version of the Mini Mental State Examination (MMSE) (Lobo et al. 1979). Depression was excluded with the shorter version of the Geriatric Depression Scale (Yesavage et al. 1983). Inclusion criteria for HO subjects were (1) absence of cognitive impairment (memory, language, attention, and executive function) confirmed by neuropsychological testing; (2)

CDR global score of 0 (no dementia); and (3) normal independent function. Depression symptoms were excluded by using the same criteria as for aMCI subjects. HO and aMCI subjects were tested with the same neuropsychological battery.

Cerebral magnetic resonance imaging (MRI) was previously examined in all participants to rule out lesions such as territorial cerebral infarction, brain tumor, hippocampal sclerosis, and/or vascular malformations. Those participants with periventricular and/or deep WM lesions, as revealed by scores ≥ 2 on the Fazekas ischemic scale (Fazekas et al. 1987), were excluded from the study. Subjects reporting a history of neurological, psychiatric disorders, and/or major medical illness (chronic renal, hepatic, pulmonary or endocrine) were not allowed to participate.

The absence of secondary causes of cognitive deficits was assessed by laboratory tests including complete blood count, blood chemistry, vitamin B12/folate, and thyroid function. None of the participants were taking cholinesterase inhibitors, and/or psychiatric medication at the time of recruiting or during the study.

APOE genotyping

Genomic DNA was isolated from blood using a standard salting-out protocol (Miller et al. 1988), and ApoE polymorphisms were determined by using pre-designed TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystem, assays ID C_3084793_20 and C_904973_10). The presence/absence of the ApoE $\epsilon 4$ allele was not employed as an inclusion criterion during the recruiting process.

Plasma A β levels

Venous blood samples were obtained after overnight fasting. Blood samples were collected in 10 mL K2-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) coated tubes (BD Diagnostics), and further centrifuged (3,500 rpm) at 4 °C for 5 min. Supernatant plasma was collected and aliquoted into 250- μ L polypropylene tubes containing 8.32 μ L of a protease inhibitor cocktail (cOmplete Ultra Tablets mini, Roche). Plasma samples were stored at -80 °C and thawed immediately before assay.

Plasma A β levels were measured blind to cognitive status in duplicate samples (50 μ L) according to manufacturer's instructions (Applied Biosystem). Averaged values (pg/mL) were used for statistical analyses. Human A β_{40} and ultra sensitive A β_{42} specific enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits were used for this purpose. The detection limit of these assays was 0.52 pg/mL for A β_{40} and 0.27 pg/mL for A β_{42} . Both inter-assay and intra-assay coefficients of variation were below 10 %. The A β_{42} /A β_{40} ratio was

additionally computed for each subject given its ability to identify cognitively normal subjects who later convert to MCI or AD (Graff-Radford et al. 2007).

EEG recordings and signal preprocessing

EEG recordings were obtained from 59 scalp electrodes referenced to linked-mastoids, and positioned according to the extended International 10-20 system (Fp1, Fp2, AF7, AF3, AFz, AF4, AF8, F7, F5, F3, F1, Fz, F2, F4, F6, F8, FT7, FC5, FC3, FC1, FCz, FC2, FC4, FC6, FT8, T7, C5, C3, C1, Cz, C2, C4, C6, T8, TP7, CP5, CP3, CP1, CPz, CP2, CP4, CP6, TP8, P7, P5, P3, P1, Pz, P2, P4, P6, P8, PO7, PO3, POz, PO4, PO8, O1, O2). Additional electrodes were placed for monitoring vertical-horizontal eye movements and the muscular tone. Continuous EEG recordings were performed in resting state with eyes closed for 10 min between 9 and 10 AM. The vigilance level was constantly monitored to avoid alpha slowing related to drowsiness (Santamaria and Chiappa 1987). Electrophysiological measurements were amplified (BrainAmp MR, Brain Vision®), filtered (0.1–100 Hz bandpass), digitized (250 Hz, 16-bit resolution), and stored in digital format for subsequent analyses.

EEG epochs were transformed into the common average reference to partially avoid pernicious effects of reference on neural-phase synchrony results (Schiff 2005). Ocular and muscle artifacts were removed by applying Independent Component Analysis (Infomax algorithm), as implemented in the BrainVision Analyzer software v. 1.05 (Brain Products® GmbH). The remaining noisy epochs were manually selected and excluded from further analysis. 60 s of artifact-free EEG epochs containing prominent alpha rhythm were selected from each participant. The alpha peak frequency, defined as the maximum value of spectral power within the alpha band, was computed for each subject. Finally, selected EEG epochs were bandpass filtered within the alpha peak frequency plus/minus 0.5 Hz (Kaiser filter, filter order: 1,326th, frequency attenuation: 0.5 Hz).

Determining neural-phase coupling in resting-state cortical networks

We calculated instantaneous phases with the Hilbert transform. Neural-phase coupling between pair-wise combinations of EEG signals was computed using the phase-lag index (PLI, Stam et al. 2007):

$$PLI = | \langle \text{sign}[\Delta\varphi(t_k)] \rangle |$$

where $\Delta\varphi(t_k)$ represents the phase difference between the two EEG signals in the time sample t_k . The PLI quantifies how consistently one EEG signal is phase leading or

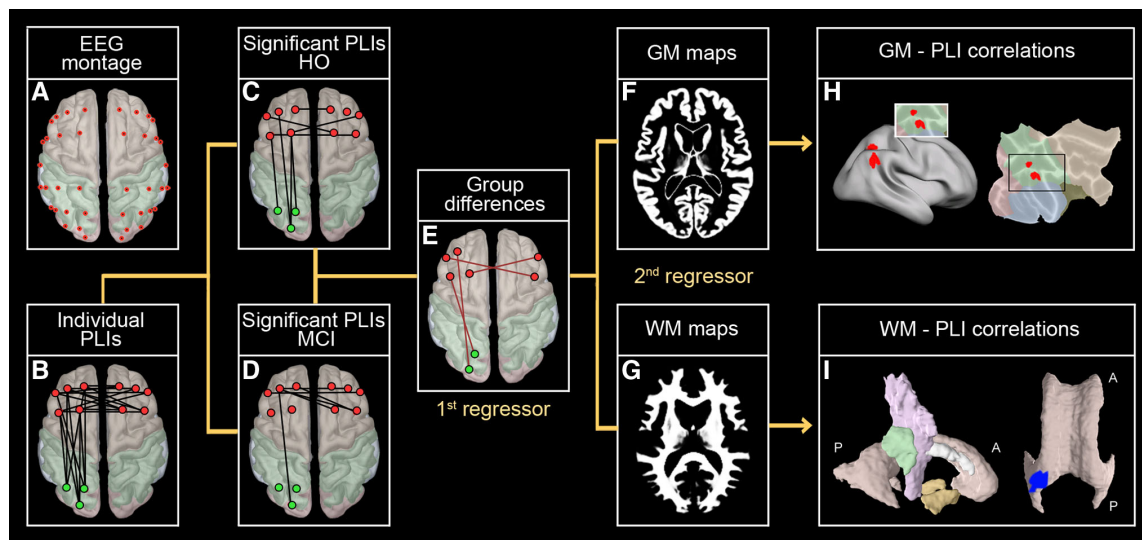


Fig. 1 Flow chart illustrating the analysis pipeline followed in the study. **a** Spatial arrangement of EEG electrodes. **b** Patterns of neural-phase coupling computed with the phase-lag index (PLI) between pairs of electrodes placed within the same (380 intra-hemispheric connections) or different cortical hemispheres (400 inter-hemispheric connections) for each subject. **c, d** Significant PLIs obtained in each group (HO, aMCI; aMCI ApoE ϵ 4 carriers; aMCI ApoE ϵ 4 noncarriers) after statistical comparison with thresholded surrogate PLIs. Only those PLIs that reached statistical significance in at least one of the two groups were selected for group comparisons. **e** Significant PLIs resulting from group comparisons were introduced as the first regressor in the general regression model. **f, g** Individual

gray matter (GM) and white matter (WM) maps registered to their average by using DARTEL (Ashburner 2007). Smoothed warped GM and WM maps were introduced, separately, as the second regressor in the general regression model. **h** Group differences in the regression coefficients between PLI changes and cortical GM represented on cortical surfaces. Cortical flattening allowed a better display of significant changes by zooming the affected region. **i** Group differences in the regression coefficients between PLI changes and cerebral WM registered to major fiber tracts derived from histological sections of human post-mortem brains (Burgel et al. 2006). A anterior, P posterior

lagging another EEG signal across time, disregarding zero-lag phase differences likely due to volume conduction and/or active reference electrodes. PLI values range from 0 (no phase coupling) to 1 (perfect phase locking). We selected 7 EEG epochs of 8-s length filtered in the alpha peak frequency (± 0.5 Hz) for each subject. For each electrode pair and subject, we obtained a PLI value that resulted from averaging PLIs computed for each of the above EEG segments. The same procedure was applied to surrogate data (see below).

Significant PLIs within each group (HO and aMCI) and group differences in PLIs were determined (Fig. 1, panels a–e). In order to obtain intra- and inter-hemispheric functional connectivity patterns, EEG locations were previously grouped into four regions of interest (ROIs) for the left hemisphere (frontal ROI: F7, F5, F3, F1, FC5, FC3, FC1; temporal ROI: FT7, T7, TP7; parietal ROI: Cp5, CP3, Cp1, P7, P5, P3, P1; and occipital ROI: PO7, PO3, O1) and their homologous ROIs for the right hemisphere. Midline placements and other EEG derivations commonly affected by muscular and oculomotor artifacts were removed from further

analyses. PLIs were computed within each ROI as well as between ROIs for both intra- and inter-hemispheric pairs of EEG signals. Overall, we computed 780 PLIs for each subject: 380 PLIs within the same hemisphere and 400 PLIs between cortical hemispheres.

Cerebral MRI acquisition and image preprocessing

Cerebral MRIs were acquired on a whole-body Philips Achieva 3T MRI scanner (Philips, The Netherlands) equipped with an 8-channel head coil. Two concomitant high-resolution MP-RAGE (magnetization-prepared rapid gradient echo) T1-weighted anatomical scans were obtained for each participant, which were averaged after motion correction to enhance the signal-to-noise ratio. Acquisition parameters were empirically optimized to increase the GM/WM contrast (repetition-time = 2,300 ms, echo-time = 4.5 ms, flip angle = 8° , matrix dimensions 256×192 , 184 contiguous sagittal 1.2 mm thick slices, time per acquisition = 5.4 min).

Cerebral MRIs were visually inspected for artifacts (e.g., excessive blurring due to head motion). Scans with poor

quality were repeated within the same week. Next, structural brain images were skull-stripped to enhance the spatial normalization accuracy and improve the reliability of voxel-based morphometry (VBM) techniques (Acosta-Cabronero et al. 2008). Skull stripping was performed with Freesurfer v.5.0 (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>) by using a hybrid approach that combines watershed algorithms and a deformable surface (Segonne et al. 2004). Removal of non-brain tissues, particularly dura, and brain tissue erosions were manually corrected on a slice-by-slice basis in the MRI of each participant. Cerebral images were processed and analyzed by using an optimized procedure of VBM implemented in SPM8 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>) as described below.

T1-images were first co-registered to the Montreal Neurological Institute (MNI) canonical brain (skull-stripped Colin27) (Collins et al. 1994) using a 12-parameter affine transformation without non-linear steps, and further resampled to an isotropic voxel size (1 mm^3). Next, normalized MRIs were partitioned into GM, WM and CSF. GM and WM maps were then registered to their average using DARTEL, a fast diffeomorphic image registration algorithm that minimizes anatomical variations among subjects preserving topology (Ashburner 2007). To maintain the total amount of GM and WM within the normalized compartments, GM and WM maps were multiplied by relative volumes of warped and unwarped structures derived from the non-linear step of spatial normalization (Jacobian determinants) (Ashburner and Friston 2000). Resultant modulated warped GM and WM maps were smoothed with an isotropic Gaussian kernel of 16 mm. The output of the above processes is shown in Fig. 1f, g.

Statistical analyses

We previously assessed the normality assumption of our data by using the Kolmogorov–Smirnov test. All demographics, cognitive, and plasma A β values were normally distributed, allowing us to apply parametric statistical tests.

Group differences in demographic and cognitive variables were assessed with unpaired t tests, whereas the influence of gender and ApoE $\epsilon 4$ genotype was tested with the Chi-square test due to the categorical nature of these variables. Group differences in A β levels (A β_{40} , A β_{42} , A β_{42} /A β_{40} ratio) were assessed by a multivariate analysis of covariance (MANCOVA), adjusted for age and gender. These statistical analyses were performed with SPSS v. 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

A bootstrap method was employed to determine if PLI values were significantly above noise and, consequently, had physiological meaning (Lachaux et al. 1999). For each pair of EEG signals, we generated 2,000 surrogate data by adding a temporal shift (a random lag between 4

and 8 s) in one of the two EEG signals originally used to compute the PLI. Surrogate data was then used to compute distribution of 2,000 PLI values for each pair of EEG signals. The PLI value corresponding to the 95th quantile of the surrogate distribution was chosen as the significance threshold. Original PLIs obtained in each group were compared to the thresholded surrogate-PLIs using the Wilcoxon–Mann–Whitney test (Pereda et al. 2005). Only those PLIs that reached statistical significance ($p < 0.05$) in at least one of the two groups were selected for further analyses.

Next, we determined group differences for each significant PLI as follows. Significant PLIs were permuted by randomly assigning a number of HO subjects to the aMCI group. We computed the T^2 statistic on each permutation ($n = 2,000$), selected the maximum ($\max T^2$) for each PLI, and used the 95th quantile of this $\max T^2$ distribution as statistical threshold to retain or reject the null hypothesis of no group differences. This procedure is directed at controlling the family-wise error (FWE) rate for all pairs of electrodes jointly (Maris 2004). Only those PLI values that showed significant group differences ($p < 0.05$, FWE corrected) were reported in the current study, and were further included in regression analyses to study relationships with neuroanatomical descriptors.

Group differences in cortical GM and cerebral WM volume were assessed with the modulated VBM approach implemented in SPM8 (ANCOVA with age, gender, and total volume of either GM or WM as covariates, $p < 0.05$ FWE corrected).

Voxel-wise linear regression analyses were performed to determine anatomical correlates (cortical GM and cerebral WM) of impaired patterns of resting-state neural-phase coupling (Fig. 1h, i). These analyses included group (HO, aMCI, aMCI ApoE $\epsilon 4$ carriers; aMCI ApoE $\epsilon 4$ noncarriers), age, gender, total volume of cortical GM or cerebral WM, and PLI as regressors. To avoid multicollinearity due to spurious correlations between different PLIs, regression analyses were performed for each significant PLI separately (Z score transformed). PLIs were split into two groups to test for group differences (T-contrasts) in the way that PLI changes correlated with variations in cortical GM/cerebral WM volume ($p < 0.05$ FWE corrected). Regression slopes were compared when correlations reached statistical significance in at least one of the two groups. A similar approach was employed to study relationships between cortical GM/cerebral WM and plasma A β levels (A β_{40} , A β_{42} , A β_{42} /A β_{40} ratio).

To localize significant group differences/correlations in GM/WM, we used the skull-stripped MNI-Colin27 template implemented in the Anatomy Toolbox v1.5. Location of significant WM changes were obtained from maps of maximum probabilities derived from the fiber tracts

Table 1 Demographic characteristics, cognitive profile, and ApoE $\epsilon 4$ distribution

	HO ($n = 26$)	aMCI ($n = 29$)	p	aMCI $\epsilon 4^-$ ($n = 15$)	aMCI $\epsilon 4^+$ ($n = 14$)	p
Age (years)	66.5 \pm 4.9	70.2 \pm 6.8	<0.08	68.6 \pm 7.1	71.8 \pm 6.2	<0.2
Gender (F/M)	15/11	10/19	<0.09	3/12	7/7	<0.09
Education (years)	8.6 \pm 4.3	8.2 \pm 5.4	<0.8	7.7 \pm 5.2	8.8 \pm 5.7	<0.6
CDR (sum of boxes)	0	0.5	N/A	0.5	0.5	N/A
MMSE	28.3 \pm 1.3	26.8 \pm 2.6	<0.01*	27.5 \pm 2.6	26.0 \pm 2.5	<0.1
Immediate recall	14.2 \pm 3.1	9.2 \pm 2.9	<10 ⁻⁶ *	10.3 \pm 2.7	8.0 \pm 2.7	<0.03*
Delayed recall	13.2 \pm 2.9	5.6 \pm 3.7	<10 ⁻¹⁰ *	6.8 \pm 3.9	4.3 \pm 3.2	<0.07

Results are expressed as mean \pm SD (standard deviation)

$\epsilon 4^-$, ApoE $\epsilon 4$ non-carriers; $\epsilon 4^+$, ApoE $\epsilon 4$ carriers; F/M, female/male; CDR, Clinical Dementia Rating; CDR = 0, no dementia; CDR = 0.5, questionable or very mild dementia; MMSE, Mini Mental State Examination; N/A, not applicable

* $p < 0.05$

included in the Anatomy Toolbox v1.5, based on microscopically defined localization derived from histological sections of human post-mortem brains (Burgel et al. 2006). To determine Brodmann areas (BA) affected, skull-stripped MNI-Colin27 coordinates of peak voxels within significant GM clusters were transformed into the Talairach anatomical space (Talairach and Tournoux 1988) by using the nonlinear transformation (approach 2) (<http://imaging.mrc-cbu.cam.ac.uk/imaging/MniTalairach>).

Further regression analyses were conducted to determine if impaired patterns of cortical oscillatory coupling were related to changes in plasma A β levels (A β_{40} , A β_{42} , A β_{42} /A β_{40} ratio). To reduce the number of multiple comparisons, only those PLIs that previously exhibited significant group differences and further reached significance in Pearson's correlation ($p < 0.05$ after 1,000 Monte Carlo simulations) were included in this analysis. If at least one of the two groups reached significance, differences between regression slopes were further assessed. These regression analyses were also adjusted for age and gender.

Results

Demographics, cognitive profile, and ApoE $\epsilon 4$ genotype

Table 1 includes demographic characteristics and cognitive profile for each group. As expected, subjects with aMCI showed significantly lower scores in MMSE ($p < 0.01$), immediate ($p < 10^{-6}$) and delayed verbal memory ($p < 10^{-10}$) than HO individuals. The presence of the ApoE $\epsilon 4$ allele was approximately fourfold higher in aMCI (48.3 %) than in HO subjects (11.5 %). The $\epsilon 2/\epsilon 4$ polymorphism was detected in only one aMCI subject. aMCI ApoE $\epsilon 4$ carriers and noncarriers showed similar demographic and cognitive profiles, with the exception of

Table 2 Plasma A β levels of the study population

A β marker	HO	aMCI	p
A β_{1-40} (pg/ml)	60.5 \pm 5.4	80.6 \pm 6.1	0.01*
A β_{1-42} (pg/ml)	8 \pm 0.3	10.1 \pm 0.5	0.001*
A β_{1-42} /A β_{1-40}	0.08 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.7

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean

* Post hoc after significant MANCOVA, adjusted for age and gender

impaired immediate memory ($p < 0.03$) and a trend toward significance in delayed recall of aMCI $\epsilon 4$ carriers ($p < 0.07$).

Plasma A β levels

Table 2 shows mean values of plasma A β levels for each group. Overall, A β levels significantly differed between the two groups ($F_{3,49} = 5.2$, $p = 0.003$). Univariate analyses revealed that aMCI showed higher concentrations of A β_{40} ($p = 0.01$) and A β_{42} ($p = 0.001$) than HO subjects, whereas group differences in the A β_{42} /A β_{40} ratio didn't reach significance.

Differences in resting-state neural-phase coupling between HO and aMCI subjects

Figure 2 illustrates differences in neural-phase coupling between HO and aMCI subjects (Fig. 2a, c), and between aMCI ApoE $\epsilon 4$ -carriers and noncarriers (Fig. 2b, d). In both statistical comparisons, group differences in resting-state cortical oscillatory coupling were highly consistent across time (Fig. 2a, b, right panel). Figure 2a, b (left panel) show schematic representations of significant PLIs that differed between the two groups. Figure 2c, d display connectivity matrices showing global cortical patterns of cortical oscillatory coupling for each group (top panel) as

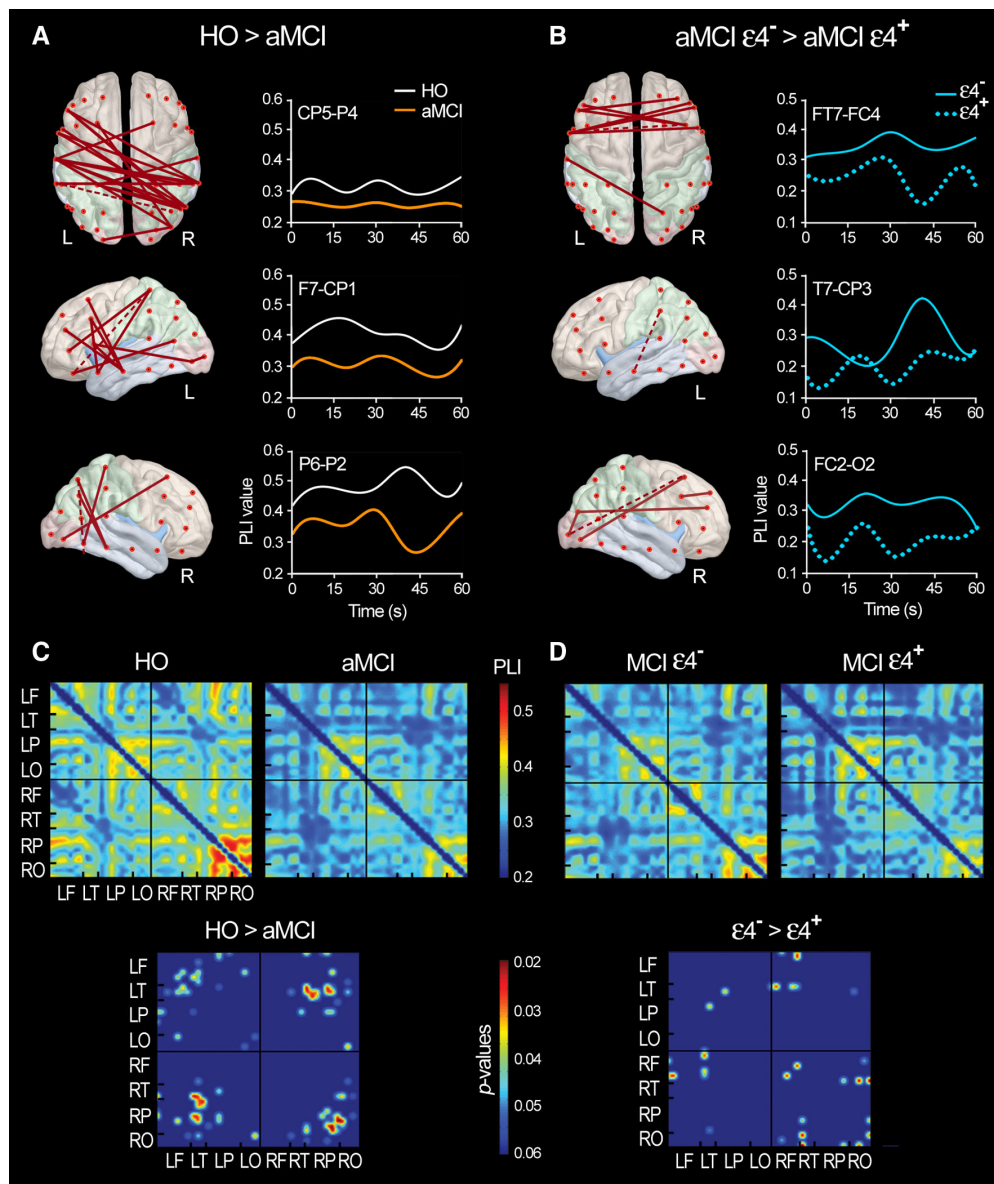


Fig. 2 Differences in the strength of neural-phase coupling between HO and aMCI subjects, and between aMCI ApoE $\epsilon 4$ carriers and noncarriers. **a, b** Leftward-most panel schematic representation of significant phase-lag indices (PLIs) that distinguished the two groups (the red dotted line indicates the PLI represented in the right plot). Rightward-most panel group differences in the time course of

significant neural-phase coupling. Note that intra- and inter-hemispheric differences in cortical oscillatory coupling were highly consistent across time (60 s). **c, d** Top panel connectivity matrix illustrating global patterns of neural-phase coupling for each group. Bottom panel significant group differences in the strength of neural-phase coupling after controlling for FWE ($p < 0.05$). L left, R right

well as significant group differences (bottom panel) after controlling for FWE ($p < 0.05$).

The aMCI group showed decreased neural synchrony patterns ($p < 0.05$, FWE corrected) in 41 of 780 PLIs (5.25 %). No significant results were found in the opposite

direction (i.e., aMCI > HO). More than half (51.2 %) of the above significant differences affected inter-hemispheric functional coupling, whereas 29.2 and 19.5 % were restricted to the left and right hemisphere, respectively (Fig. 2a). Global patterns of intra- and inter-hemispheric functional

Table 3 Volume loss of cortical GM and cerebral WM in aMCI compared to HO subjects

Brain region	CS	x	y	z	T ₄₈	p
GM						
L parahippocampal gyrus (BA 35)	201	-16	-24	-21	5.29	0.008
WM						
L medial/lateral geniculate body	1,392	-24	-25	-15	5.99	0.0001
R medial/lateral geniculate body	815	25	-24	-15	5.82	0.0003
L genu corpus callosum	272	-27	38	10	5.20	0.002
L posterior cingulum	42	-19	-32	-16	5.81	0.0003

Coordinates (x–y–z) are in the skull-stripped MNI-Colin27 brain anatomical space, and correspond to the voxel of maximum significance within the cluster. *T* values (degrees of freedom in the subscript). *T* test, *p* < 0.05 (FWE corrected)

GM gray matter, WM white matter, CS cluster size (in mm³), L left, R right, BA Brodmann area

coupling for HO and aMCI subjects are illustrated in Fig. 2c. Significant group differences (Fig. 2c, bottom panel) mainly affected neural-phase coupling between right parietal and between left temporal and left parietal regions (47.6 % of inter-hemispheric PLIs), as well as functional connections within the right parietal lobe and between right parietal and right temporal regions (35 % of intra-hemispheric PLIs). Therefore, the parietal lobe, mainly from the right hemisphere, was the cortical region that accounted for most of the resting-state connectivity failures shown by aMCI subjects.

aMCI ApoE4 carriers also presented a significant reduction of neural-phase coupling in 16 of 780 PLIs (2 %) compared to aMCI ϵ 4 noncarriers, half of them corresponding to inter-hemispheric and the other half to intra-hemispheric functional connections. As illustrated in Fig. 2b (left panel), disrupted connectivity principally affected inter-hemispheric communication between regions of the frontal lobe, whereas failures in intra-hemispheric neural coupling mostly involved regions of the frontal and parieto-occipital cortex in the right hemisphere.

Neuroanatomical differences between HO and aMCI subjects

Table 3 summarizes regions showing significant group differences in cortical GM and cerebral WM volume. Briefly, significant volume loss of cortical GM in aMCI subjects was restricted to the parahippocampal gyrus of the left hemisphere. aMCI subjects further showed bilateral WM atrophies of the medial/lateral geniculate body (thalamus), corpus callosum and posterior cingulum. No

significant differences in cortical GM or cerebral WM were detected when aMCI ϵ 4-carriers and noncarriers were compared.

Cortical GM correlates of failures in resting-state cortical oscillatory coupling

We first determined whether group differences in resting-state cortical oscillatory coupling correlated with changes in cortical GM volume in HO and/or aMCI subjects, separately. If one of these correlations were significant, we evaluated whether regression slopes differed between the two groups. Group differences in regression slopes for the relationship between cortical GM and impaired patterns of resting-state cortical oscillatory coupling are shown in Table 4 and illustrated in Fig. 3 panels a, b. Figure 3 also displays cortical locations of group differences in regression slope (panels c and d). Two results emerged from this analysis. On the one hand, neural-phase coupling between parietal and temporal regions showed positive correlations with GM volume of precuneus in aMCI. On the other, decreased functional coupling between parietal and fronto-temporal regions correlated with increased volume of the angular gyrus in aMCI. HO subjects showed opposite relationships to those observed in aMCI individuals. No significant differences in cortical GM-PLI correlations were found when aMCI ϵ 4-carriers and noncarriers were compared.

Cerebral WM correlates of failures in resting-state cortical oscillatory coupling

Further regression analyses were performed to determine whether disrupted functional coupling correlated with changes in cerebral WM in each group, and to assess whether regression slopes significantly differed between the two groups. Group differences in regression slopes for the relationship between cerebral WM and impaired patterns of resting-state cortical oscillatory coupling are shown in Table 5 and illustrated in Fig. 4. In particular, we found that increased levels of neural-phase coupling between left temporal and right parietal regions correlated with increased volume of the splenium (posterior part of the corpus callosum) in aMCI subjects. No significant differences in cortical WM-PLI correlations were found when aMCI ϵ 4-carriers and noncarriers were compared.

Relationships between plasma A β levels and neuroanatomical changes

No significant associations were found between changes in cortical GM/cerebral WM and plasma A β levels in any group (HO, aMCI, aMCI ApoE ϵ 4-carriers, aMCI ApoE ϵ 4-noncarriers).

Table 4 Group differences in correlations between cortical GM and PLIs

	Cortical region	CS	x	y	z	r	p
IT-IP (intra)	R angular gyrus (BA 39)	363	34	−53	40	0.56	0.01
HO ⁺ > aMCI [−]							
IF-rP (inter)	R angular gyrus (BA 39)	136	45	−71	35	0.41	0.003
HO ⁺ > aMCI [−]							
IT-rP (inter)	L angular gyrus (BA 39)	981	−43	−66	37	0.57	0.01
HO ⁺ > aMCI [−]							
IF-rP (inter)	R precuneus (BA 31)	318	20	−72	32	0.57	0.01
aMCI ⁺ > HO [−]							
IT-rP (inter)	R precuneus (BA 31)	292	21	−71	33	0.57	0.01
aMCI ⁺ > HO [−]							
IT-rP (inter)	R precuneus (BA 31)	200	21	−73	31	0.56	0.01
aMCI ⁺ > HO [−]							
IF-IT (intra)	R precuneus (BA 31)	196	23	−68	29	0.56	0.01
aMCI ⁺ > HO [−]							
IT-IP (intra)	R precuneus (BA 31)	498	22	−70	31	0.60	0.003
aMCI ⁺ > HO [−]	R precuneus (BA 31)	72	26	−71	29	0.56	0.02

Coordinates (x–y–z) are in the skull-stripped MNI-Colin27 brain anatomical space, and correspond to the voxel of maximum significance within the cluster. These clusters are displayed in Fig. 3 (red for HO > aMCI; blue for aMCI > HO). ^{+/−} denotes the direction of the significant within-group correlations. *p* values correspond to between-group regression analysis, after controlling for FWE rate (*p* < 0.05)

Minimum cluster size (CS), 50 voxels (in mm³); l/L, left; r/R, right; F, frontal; P, parietal; T, temporal; BA, Brodmann area

Relationships between plasma A β levels and failures in resting-state cortical oscillatory coupling

Regression analyses revealed significant relationships between lower levels of A β ₄₂ and enhanced inter-hemispheric parieto-occipital neural-phase coupling in HO subjects (*r* = −0.64, *p* < 0.001), but not in aMCI subjects. Group differences in regression slopes didn't reach significance between the two groups. No significant correlations were found between plasma A β and neural-phase coupling in either aMCI ϵ 4-carriers or noncarriers.

Discussion

This study has revealed that subjects with aMCI show failures in resting-state neural-phase coupling mostly evident in parieto-temporal regions, whereas connectivity failures showed by aMCI ApoE ϵ 4-carriers were mainly restricted to regions of the frontal lobe. Furthermore, we found that impaired functional coordination between parieto-temporal regions in aMCI subjects was significantly related to volume changes in the precuneus, angular gyrus and the splenium of the corpus callosum. These results extend previous findings providing neuroanatomical correlates of impaired patterns of cortical oscillatory coupling, which might be helpful for assessing the efficacy of therapeutic interventions aimed at restoring the integrity of

neocortical function in older adults at increased risk of developing AD.

Cortical GM correlates of impaired functional connectivity in aMCI subjects

Resting-state cortical oscillations result from highly organized patterns of synaptic activity, which is remarkably affected in AD (Scheff et al. 2006; Masliah et al. 2001). Converging evidence suggests that accumulation of A β aggregates leads to decreased dendritic spines and impaired integration of synaptic activity (Wei et al. 2010; Wu et al. 2010; Evans et al. 2008; Ingelsson et al. 2004), which is likely responsible for cognitive dysfunctions in AD. In addition, the largest A β plaques typically appear in the cortical layers III and V that are dominated by pyramidal neurons largely involved in the generation of EEG oscillations (Lopes da Silva and Van Rotterdam 1993; Silva et al. 1991).

Here, we showed that strength of cortical oscillatory coupling and volume of the precuneus were positively correlated in aMCI subjects. This aberrant anatomo-functional relationship might result from the elevated A β load accumulated in the precuneus during the course of disease (Driscoll et al. 2012; Rowe et al. 2007) leading to inflammatory reactions to A β neurotoxicity. In line with this hypothesis, previous studies have found aberrant patterns of neural-phase coupling between the precuneus and

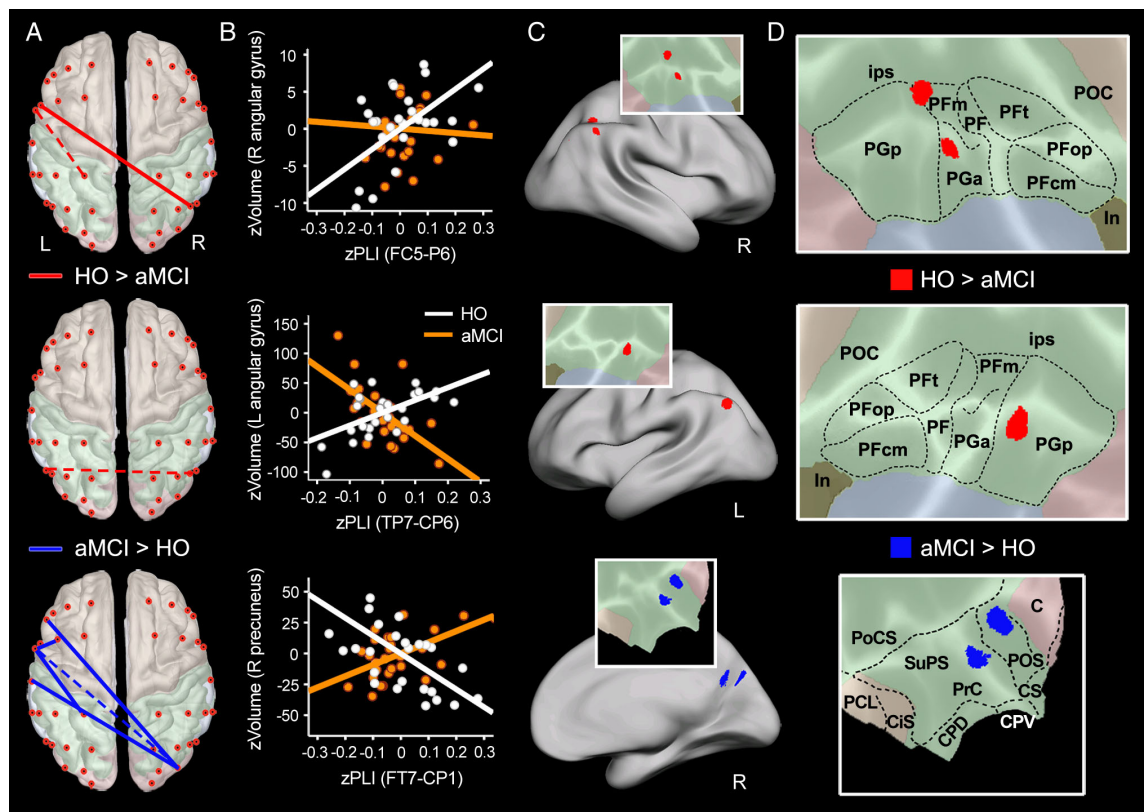


Fig. 3 Group differences (HO vs. aMCI) in regression coefficients derived from correlations between impaired neural-phase coupling and cortical gray matter (GM). **a** Different brain views displaying schematic representation of phase-lag indices (PLIs) that significantly correlated with cortical GM (red line HO > aMCI, blue line aMCI > HO). The dotted line (red or blue) indicates the PLI represented in **b**. **L** left, **R** right. **b** Regression plots displaying correlations between significant PLIs and GM changes of the right angular gyrus (top panel), left angular gyrus (middle panel), and right precuneus (bottom panel). Axis-values are transformed to Z scores. **c** Cortical locations of between-group significant differences in regression coefficients. Significant clusters are zoomed on flattened cortical surfaces for an enhanced visualization (in red, HO > aMCI;

in blue, aMCI > HO). **d** Flattened cortical maps containing major cytoarchitectonic subdivisions of significant regions. *Top and middle panels.* Abbreviations for the right/left angular gyrus (Caspers et al. 2006): POC postcentral sulcus, ips intraparietal sulcus, In insula, PGp area angularis posterior, PFm area supramarginalis magnocellularis, PGa area angularis anterior, PF area supramarginalis, PFt area supramarginalis tenuicorticalis, PFcm area supramarginalis posterior, PFop area supramarginalis in operculo. *Bottom panel.* Abbreviations for the right precuneus (Scheperjans et al. 2008): POS parieto-occipital sulcus, CS central sulcus, CPV cingulate postventral, CPD cingulate postdorsal, SuPS subparietal sulcus, PrC precuneus, CiS cingulate sulcus, PCL posterior paracentral lobe, PoCS postcentral sulcus, C cuneus

other cortical areas in aMCI patients (Cantero et al. 2009a, b; Knyazeva et al. 2013), likely revealing synaptic failures caused by the vulnerability of this region to the accumulation of A β plaques in terms of PiB retention (Driscoll et al. 2012; Rowe et al. 2007). These patterns of neuronal hypersynchronization can further be induced by application of high concentrations of A β_{42} over time (Wang et al. 2009), supporting aberrant neural coupling observed in aMCI. Alternatively, the abnormal anatomo-functional relationship revealed by aMCI might denote the activation of a compensatory mechanism before pathological changes become clinically evident. This interpretation is supported

by previous evidence showing hypertrophy of cortical neurons in autopsy brains of asymptomatic AD subjects (Iacono et al. 2008; Riudavets et al. 2007) together with enhanced cortical thickness in the precuneus of presenilin-1 (PSEN1) mutation carriers occurring before the disease onset (Forte et al. 2010).

The precuneus has been implicated in visuospatial imagery, episodic memory retrieval and self-processing operations (Cavanna and Trimble 2006), and has been integrated into a large-scale system of cortical regions referred to as the “default-mode network” (Raichle et al. 2001) showing the highest level of baseline metabolic

Table 5 Group differences in correlations between cerebral WM and PLIs

	WM fiber tract	CS	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
IT-rP (inter) aMCI ⁺ > HO ⁻	L corpus callosum (splenium)	51	-25	-53	8	0.45	0.001
IT-rP (inter) aMCI ⁺ > HO ⁺	L corpus callosum (splenium)	391	-26	-55	8	0.41	0.007
IT-rP (inter) aMCI ⁺ > HO ⁺	L corpus callosum (splenium)	254	-25	-57	7	0.36	0.01
IT-rT (inter) aMCI ⁺ > HO ⁻	L corpus callosum (splenium)	1,082	-24	-52	10	0.45	0.003
IT-rO (inter) aMCI ⁺ > HO ⁺	L corpus callosum (splenium)	138	-26	-56	10	0.36	0.01
IT-IP (intra) aMCI ⁺ > HO ⁻	L corpus callosum (splenium)	324	-28	-58	10	0.43	0.004

Coordinates (*x*-*y*-*z*) are in the skull-stripped MNI-Colin27 brain anatomical space, and correspond to the voxel of maximum significance within the cluster. These clusters are displayed in Fig. 4 (blue for aMCI > HO). ^{+/−} denotes the direction of the significant within-group correlation. *p* values correspond to between-group regression analysis, after controlling for FWE rate (*p* < 0.05)

Minimum cluster size (CS), 50 voxels (in mm³); l/L, left; r/R, right

activity in passive resting-state studies (Wang et al. 2006a, b). The precuneus has also shown a reduction of choline acetyltransferase (ChAT) activity in AD patients (Ikonomic et al. 2011), which might be caused by the impaired cholinergic innervation received from the nucleus basalis of Meynert (Mesulam et al. 1983). In addition, the elevated Aβ burden in the precuneus has been recently confirmed by regional matching between PiB retention with PET and Aβ plaque counts in post-mortem AD brains (Driscoll et al. 2012).

Interestingly, aMCI subjects showed opposite relationships with the angular gyrus, suggesting that different subsystems in the parietal lobe contribute differently to impaired patterns of long-range neural coordination in individuals with aMCI, an aspect that has been recently confirmed in resting-state fMRI studies (Liang et al. 2012). The angular gyrus is a region of the inferior parietal lobe involved in episodic memory processing (e.g., Johnson et al. 2013) whose resting-state activity is coupled with activity in regions of the hippocampal-cortical memory system (Vincent et al. 2008). This region not only has shown cortical thinning in mild AD (Dickerson et al. 2009) but also decreased functional connectivity associated with increased levels of PiB retention in HO subjects (Mormino et al. 2011), likely revealing normal aging-related changes affecting coordination of large-scale cortical systems.

Cerebral WM correlates of impaired functional connectivity in aMCI subjects

Neural-phase coupling between distant cortical regions critically depends on fiber density and axonal conduction

velocity, two parameters intrinsically related to WM integrity. These WM parameters have been successfully incorporated into neural mass models to better understand how different spatial scales of oscillatory neural coupling emerge from EEG oscillations (Pons et al. 2010; Sotero et al. 2007). Furthermore, recent evidence has contributed to reinforce the notion that WM architecture represents the most reliable neuroanatomical predictor of cortical synchronization underlying the human alpha rhythm (Valdes-Hernandez et al. 2010).

WM lesions have been found in about 60 % of the examinations performed on post-mortem AD brains, and were mainly attributed to hypoperfusion of the affected WM territories (Brun and Englund 1986). Relationships between WM integrity and intrinsic functional properties of large-scale cortical systems have begun to be unveiled in normal aging (Andrews-Hanna et al. 2007) and different neurodegenerative conditions (Seeley et al. 2009). By using combined measurements of EEG coherence and WM microstructure, Teipel et al. (2009) showed that inter-hemispheric frontal coherence in the alpha band significantly correlated with DTI-diffusivity in WM of the anterior corpus callosum, frontal lobe, thalamus, pons, and cerebellum in both HO and aMCI subjects, although this pattern of anatomo-functional correlation was not able to distinguish between the two groups.

The corpus callosum plays an important role in the maintenance of inter-hemispheric communication through homotopic and heterotopic callosal projections (Innocenti 1986), also affecting inter-hemispheric coordination of EEG-alpha oscillatory properties (Cantero et al. 2000; Koeda et al. 1995). Previous studies have reported failures

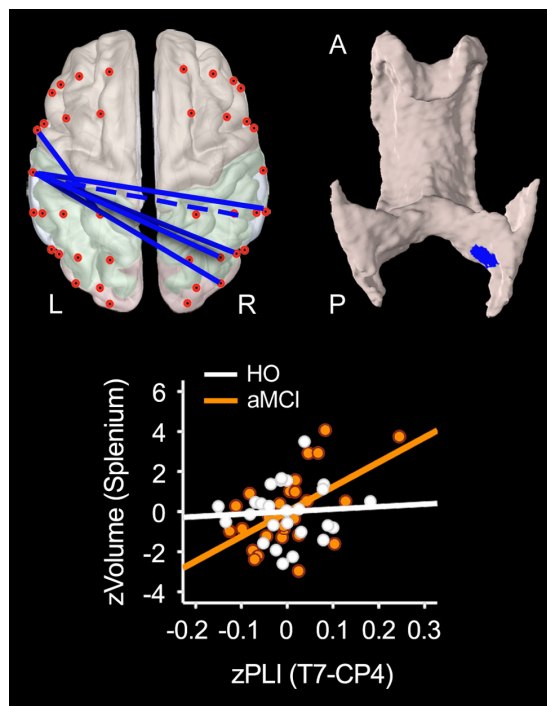


Fig. 4 Group differences (HO vs. aMCI) in regression coefficients derived from correlations between impaired neural-phase coupling and cerebral white matter (WM). *Upper left panel* Brain view displaying schematic representation of phase-lag indices (PLIs) that significantly correlated with cerebral WM (blue line aMCI > HO). The blue dotted line indicates the PLI represented in the regression plot (bottom panel). *Upper right panel* Locations of between-group significant differences in regression coefficients (aMCI > HO) were restricted to the posterior part of the corpus callosum (splenium). *Bottom panel* Regression plot displaying correlations between a significant PLI and WM changes in the splenium. Axis-values are transformed to Z scores. L left, R right, A anterior, P posterior

in inter-hemispheric neural coupling (Stam et al. 2006; Wada et al. 1998) associated with volume changes of corpus callosum in AD patients (Pogarell et al. 2005; Hampel et al. 2002). Here, we showed that this relationship can also be extended to aMCI subjects. In particular, we have found that enhanced inter-hemispheric functional coordination between temporo-parietal regions correlated with increased WM in the splenium of the corpus callosum in aMCI subjects.

This finding is supported by converging evidence. Firstly, the splenium is an important anatomical substrate of alpha generation. It sends massive axonal projections to posterior visual regions, including the occipital and parietal cortex (Putnam et al. 2010), considered as the canonical cortical generators of the alpha rhythm in higher mammals (Cantero et al. 2002; Lopes da Silva and Storm Van Leeuwen 1977). And secondly,

neuropathological lesions affect the splenium even in the prodromal stages of AD (Delano-Wood et al. 2012; Zhuang et al. 2010; Di Paola et al. 2010; Mielke et al. 2009; Ukmar et al. 2008; Wang et al. 2006a, b). In fact, aMCI and HO subjects are best differentiated when combining fractional anisotropy measurements of both the splenium of the corpus callosum and fornix (Zhuang et al. 2010).

Impaired cortical oscillatory coupling is differently affected in aMCI ApoE $\epsilon 4$ carriers

The presence of the allele $\epsilon 4$ of ApoE has been associated with small vessel arteriolosclerosis, microinfarcts of the deep nuclei, neuritic senile plaque density, and amyloid angiopathy in post-mortem AD brains (Yip et al. 2005). The ApoE $\epsilon 4$ allele is also more prevalent in MCI than in HO subjects (Boyle et al. 2010) and correlates with memory deficits and hippocampal atrophy in MCI (Farlow et al. 2004). However, how the ApoE $\epsilon 4$ polymorphism affects resting-state cortical oscillatory networks in subjects with aMCI has remained mostly unknown.

Here, we identified a more pronounced impairment of neural-phase synchronization in aMCI ApoE $\epsilon 4$ -carriers compared to noncarriers. This impairment mainly affected functional inter-hemispheric coordination within the frontal lobe. This finding might be accounted for by the lower levels of choline acetyltransferase observed in the frontal cortex of AD patients carrying the ApoE $\epsilon 4$ polymorphism (Soininen et al. 1995). Moreover, transcallosal frontal connections are significantly damaged in cognitively normal subjects carrying the ApoE $\epsilon 4$ allele (Filippini et al. 2009), supporting the impaired connectivity of the frontal lobe observed in aMCI ApoE $\epsilon 4$ -carriers in our study.

Mechanisms accounting for the ApoE $\epsilon 4$ impact on impaired patterns of neural coordination are poorly understood to date. In vitro experiments performed with transgenic mice expressing human ApoE $\epsilon 4$ showed that increased $\epsilon 4$ expression was accompanied by decreased sprouting in hippocampal granule cell mossy fiber (Teter et al. 2002), likely preventing regeneration of synaptic circuitry after neural damage as well as reestablishment of functional connectivity patterns in large-scale cerebral networks. Furthermore, ApoE $\epsilon 4$ modulates processing of the amyloid precursor protein, leading to an elevated production of the A β peptide in cultured neuronal cells (Ye et al. 2005). In vivo experiments with older mice have added further support to the hypothesis that ApoE $\epsilon 4$ enhances A β deposition compared with other ApoE isoforms (Holtzman et al. 2000). However, and contrary to what would be expected, we failed to demonstrate the existence of a significant relationship between impaired

cortical oscillatory coupling and changes in plasma A β levels in aMCI subjects, which might be attributed to the small sample size, the possible heterogeneity of our aMCI sample, the nature of A β measurements (plasma from peripheral blood), and/or the cross-sectional nature of the study.

Whether or not plasma A β concentrations reveal brain amyloidosis remains an ongoing controversy (Hampel et al. 2011; Koyama et al. 2012; Rissman et al. 2012; Takeda et al. 2010). Whereas some studies have found correlations between blood A β levels and dementia risk and/or disease progression (Mayeux et al. 2003; Schupf et al. 2008; Abdullah et al. 2009; van Oijen et al. 2006), others have not (Fukumoto et al. 2003; Hansson et al. 2010; Roher et al. 2009). We showed that plasma A β concentrations are significantly higher in aMCI than in HO subjects. However, results derived from cross-sectional studies using plasma A β in MCI patients are largely inconsistent (Pesini et al. 2012; Storace et al. 2010; Blasko et al. 2008; Sobów et al. 2005), likely due to the instability of A β peptides in plasma (Humpel 2011), the state of aggregation (Storace et al. 2010), and the heterogeneity of MCI populations across studies. In agreement with our results, only those studies that specifically evaluated MCI of amnesic type have found higher plasma levels of A β_{42} compared to HO subjects (Storace et al. 2010; Sobów et al. 2005; Pesini et al. 2012).

Evidence has shown that plasma A β levels are not associated with amyloid burden in post-mortem AD brains (Freeman et al. 2007). However, these results need to be interpreted with caution because they were derived from histological sections of the frontal lobe instead of brain regions typically affected by AD lesions. Findings regarding the link between plasma A β levels and cerebral amyloid load measured by PET-PiB retention are also inconsistent. For instance, increased PiB binding has been reported to be accompanied by lower plasma A β levels (Devanand et al. 2011; Lui et al. 2010), supporting the “sink” hypothesis that increased brain A β is accompanied by lower peripheral levels of A β . But this relationship was limited to CSF A β_{42} in cognitively normal individuals (Fagan et al. 2009), indicating that A β_{42} levels in plasma do not reflect the amount of amyloid in the brain of HO adults. Taken together, these results suggest a complex relationship between brain amyloidosis, blood A β and AD stage, which might significantly impact data interpretation. Further longitudinal research combining plasma A β with other biomarkers in non-demented older adults and pre-clinical AD, confirmed by CSF A β and/or amyloid-PET markers, is clearly needed to determine whether plasma A β has diagnostic value with disease progression together with other biomarkers.

Study limitations

This study has several limitations that need mentioning. First, our sample was relatively small and lacked in vivo markers of AD pathology (i.e., CSF A β -tau and/or amyloid-PET), impeding reliable confirmation of preclinical AD in the current study. Further research with larger populations including the above markers is required to increase the generalizability of our results and to put them in context of AD. Second, the cross-sectional nature of the study impeded tracking the longitudinal course of anatomic-functional changes in aMCI and, therefore, establishing the predictive value of this marker on preclinical AD. Due to this limitation, how many aMCI subjects will progress to AD, how many will remain stable, or how many will revert to cognitively normal status later on were unknown issues and a challenge for further investigation.

Acknowledgments This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2011-25463; PSI2011-24922), the Regional Ministry of Innovation, Science and Enterprise, Junta de Andalucía (P12-CTS-2327), and CIBERNED (CB06/05/1111). The authors declare no competing financial interests.

References

- Abdullah L, Luis C, Paris D, Mouzon B, Ait-Ghezala G, Keegan AP, Wang D, Crawford F, Mullan M (2009) Serum Abeta levels as predictors of conversion to mild cognitive impairment/Alzheimer disease in an ADAPT subcohort. *Mol Med* 15:432–437
- Acosta-Cabronero J, Williams GB, Pereira JM, Pengas G, Nestor PJ (2008) The impact of skull-stripping and radio-frequency bias correction on grey-matter segmentation for voxel-based morphometry. *Neuroimage* 39:1654–1665
- Acosta-Cabronero J, Williams GB, Pengas G, Nestor PJ (2010) Absolute diffusivities define the landscape of white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Brain* 133:529–539
- Andrews-Hanna JR, Snyder AZ, Vincent JL, Lustig C, Head D, Raichle ME, Buckner RL (2007) Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron* 56:924–935
- Arendt T (2009) Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118:167–179
- Ashburner J (2007) A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage* 38:95–113
- Ashburner J, Friston KJ (2000) Voxel-based morphometry—the methods. *Neuroimage* 11:805–821
- Babiloni C, Ferri R, Binetti G, Cassarino A, Dal Forno G, Ercolani M, Ferreri F, Frisoni GB, Lanuzza B, Miniussi C, Nobili F, Rodriguez G, Rundo F, Stam CJ, Musha T, Vecchio F, Rossini PM (2006a) Fronto-parietal coupling of brain rhythms in mild cognitive impairment: a multicentric EEG study. *Brain Res Bull* 69:63–73
- Babiloni C, Frisoni G, Steriade M, Bresciani L, Binetti G, Del Percio C, Geroldi C, Miniussi C, Nobili F, Rodriguez G, Zappasodi F, Carfagna T, Rossini PM (2006b) Frontal white matter volume and delta EEG sources negatively correlate in awake subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Clin Neurophysiol* 117:1113–1129

- Babiloni C, Benussi L, Binetti G, Cassetta E, Dal Forno G, Del Percio C, Ferreri F, Ferri R, Frisoni G, Ghidoni R, Miniussi C, Rodriguez G, Romani GL, Squitti R, Ventriglia MC, Rossini PM (2006c) Apolipoprotein E and alpha brain rhythms in mild cognitive impairment: a multicentric electroencephalogram study. *Ann Neurol* 59:323–334
- Babiloni C, Carducci F, Lizio R, Vecchio F, Baglieri A, Bernardini S, Cavado E, Bozzao A, Buttinelli C, Esposito F, Giubilei F, Guizzaro A, Marino S, Montella P, Quattrocchi CC, Redolfi A, Soricelli A, Tedeschi G, Ferri R, Rossi-Fedele G, Ursini F, Scarsia F, Vernieri F, Pedersen TJ, Hardemark HG, Rossini PM, Frisoni GB (2013) Resting state cortical electroencephalographic rhythms are related to gray matter volume in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp* 34:1427–1446
- Blankenship AG, Feller MB (2010) Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 11:18–29
- Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Tragl KH, Fischer P (2008) Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging* 29:1–11
- Böhmer P, Peña-Casanova J, Aguilar M, Hernandez G, Sol JM, Blesa R, NORMACODEN Group (1998) Clinical validity and utility of the interview for deterioration of daily living in dementia for Spanish-speaking communities. *Int Psychogeriatr* 10:261–270
- Boyle PA, Buchman AS, Wilson RS, Kelly JF, Bennett DA (2010) The APOE epsilon4 allele is associated with incident mild cognitive impairment among community-dwelling older persons. *Neuroepidemiology* 34:43–49
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259
- Brier MR, Thomas JB, Snyder AZ, Benzinger TL, Zhang D, Raichle ME, Holtzman DM, Morris JC, Ances BM (2012) Loss of intranetwork and internetwork resting state functional connections with Alzheimer's disease progression. *J Neurosci* 32:8890–8899
- Brun A, Englund E (1986) A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type: a pathoanatomical study. *Ann Neurol* 19:253–262
- Burgel U, Amunts K, Hoemke L, Mohlberg H, Gilsbach JM, Zilles K (2006) White matter fiber tracts of the human brain: three-dimensional mapping at microscopic resolution, topography and intersubject variability. *Neuroimage* 29:1092–1105
- Cantero JL, Atienza M, Salas RM (2000) State-modulation of cortico-cortical connections underlying normal EEG alpha variants. *Physiol Behav* 71:107–115
- Cantero JL, Atienza M, Salas RM (2002) Human alpha oscillations in wakefulness, drowsiness period, and REM sleep: different electroencephalographic phenomena within the alpha band. *Neurophysiol Clin* 32:54–71
- Cantero JL, Atienza M, Gomez-Herrero G, Cruz-Vadell A, Gil-Neciga E, Rodriguez-Romero R, Garcia-Solis D (2009a) Functional integrity of thalamocortical circuits differentiates normal aging from mild cognitive impairment. *Hum Brain Mapp* 30:3944–3957
- Cantero JL, Atienza M, Cruz-Vadell A, Suarez-Gonzalez A, Gil-Neciga E (2009b) Increased synchronization and decreased neural complexity underlie thalamocortical oscillatory dynamics in mild cognitive impairment. *Neuroimage* 46:938–948
- Canuet L, Tellado I, Couceiro V, Fraile C, Fernandez-Nova L, Ishii R, Takeda M, Cacabelos R (2012) Resting-state network disruption and APOE genotype in Alzheimer's disease: a lagged functional connectivity study. *PLoS ONE* 7(9):e46289
- Caspers S, Geyer S, Schleicher A, Mohlberg H, Amunts K, Zilles K (2006) The human inferior parietal lobule: cytoarchitectonic parcellation and interindividual variability. *Neuroimage* 33:430–448
- Cavanna AE, Trimble MR (2006) The precuneus: a review of its functional anatomy and behavioural correlates. *Brain* 129:564–583
- Chetelat G, Landeau B, Eustache F, Mezenge F, Viader F, de la Sayette V, Desgranges B, Baron JC (2005) Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI, a longitudinal MRI study. *Neuroimage* 27:934–946
- Collins D, Neelin P, Peters T, Evans A (1994) Automatic 3D intersubject registration of MR volumetric data in standardized Talairach space. *J Comp Ass Tomogr* 18:192–205
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921–923
- de Waal H, Stam CJ, de Haan W, van Straaten EC, Blankenstein MA, Scheltens P, van der Flier WM (2013) Alzheimer's disease patients not carrying the apolipoprotein E ε4 allele show more severe slowing of oscillatory brain activity. *Neurobiol Aging* 34:2158–2163
- Deco G, Jirsa V, McIntosh AR, Sporns O, Kötter R (2009) Key role of coupling, delay, and noise in resting brain fluctuations. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:10302–10307
- Delano-Wood L, Stricker NH, Sorg SF, Nation DA, Jak AJ, Woods SP, Libon DJ, Delis DC, Frank LR, Bondi MW (2012) Posterior cingulum white matter disruption and its associations with verbal memory and stroke risk in mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 29:589–603
- Devanand DP, Schupf N, Stern Y, Parsey R, Pelton GH, Mehta P, Mayeux R (2011) Plasma Aβ and PET PiB binding are inversely related in mild cognitive impairment. *Neurology* 77:125–131
- Dhamala M, Jirsa VK, Ding M (2004) Enhancement of neural synchrony by time delay. *Phys Rev Lett* 92:074104
- Di Paola M, Di Iulio F, Cherubini A, Blundo C, Casini AR, Sancesario G, Passafiume D, Caltagirone C, Spalletta G (2010) When, where, and how the corpus callosum changes in MCI and AD: a multimodal MRI study. *Neurology* 74:1136–1142
- Dickerson BC, Bakkour A, Salat DH, Feczko E, Pacheco J, Greve DN, Grodzstein F, Wright CI, Blacker D, Rosas HD, Sperling RA, Atri A, Growdon JH, Hyman BT, Morris JC, Fischl B, Buckner RL (2009) The cortical signature of Alzheimer's disease: regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cereb Cortex* 19:497–510
- Driscoll I, Troncoso JC, Rudow G, Sojkova J, Pletnikova O, Zhou Y, Kraut MA, Ferrucci L, Mathis CA, Klunk WE, O'Brien RJ, Davatzikos C, Wong DF, Resnick SM (2012) Correspondence between in vivo (11)C-PiB-PET amyloid imaging and post-mortem, region-matched assessment of plaques. *Acta Neuropathol* 124:823–831
- Evans NA, Facci L, Owen DE, Soden PE, Burbidge SA, Prinjha RK, Richardson JC, Skaper SD (2008) Abeta1–42 reduces synapse number and inhibits neurite outgrowth in primary cortical and hippocampal neurons: a quantitative analysis. *J Neurosci Methods* 175:96–103
- Fagan AM, Mintun MA, Shah AR, Aldea P, Roe CM, Mach RH, Marcus D, Morris JC, Holtzman DM (2009) Cerebrospinal fluid tau and ptau(181) increase with cortical amyloid deposition in cognitively normal individuals: implications for future clinical trials of Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 1:371–380

- Farlow MR, He Y, Tekin S, Xu J, Lane R, Charles HC (2004) Impact of APOE in mild cognitive impairment. *Neurology* 63:1898–1901
- Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA (1987) MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *Am J Roentgenol* 149:351–356
- Filippini N, Zarei M, Beckmann CF, Galluzzi S, Borsci G, Testa C, Bonetti M, Beltramello A, Ghidoni R, Benussi L, Binetti G, Frisoni GB (2009) Regional atrophy of transcallosal prefrontal connections in cognitively normal APOE epsilon4 carriers. *J Magn Reson Imaging* 29:1021–1026
- Fortea J, Sala-Llonch R, Bartres-Faz D, Bosch B, Llado A, Bargallo N, Molinuevo JL, Sanchez-Valle R (2010) Increased cortical thickness and caudate volume precede atrophy in PSEN1 mutation carriers. *J Alzheimers Dis* 22:909–922
- Freeman SH, Raju S, Hyman BT, Frosch MP, Irizarry MC (2007) Plasma Abeta levels do not reflect brain Abeta levels. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:264–271
- Fukamoto H, Tennis M, Locascio JJ, Hyman BT, Growdon JH, Irizarry MC (2003) Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch Neurol* 60:958–964
- Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG (2007) Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 64:354–362
- Hampel H, Teipel SJ, Alexander GE, Pogarell O, Rapoport SI, Möller HJ (2002) In vivo imaging of region and cell type specific neocortical neurodegeneration in Alzheimer's disease. Perspectives of MRI derived corpus callosum measurement for mapping disease progression and effects of therapy. Evidence from studies with MRI, EEG and PET. *J Neural Transm* 109:837–855
- Hampel H, Wilcock G, Andrieu S, Aisen P, Blennow K, Broich K, Carrillo M, Fox NC, Frisoni GB, Isaac M, Lovestone S, Nordberg A, Prvulovic D, Sampaio C, Scheltens P, Weiner M, Winblad B, Coley N, Vellas B, Oxford Task Force Group (2011) Biomarkers for Alzheimer's disease therapeutic trials. *Prog Neurobiol* 95:579–593
- Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E, Wallin A, Minthon L, Blennow K (2010) Evaluation of plasma Abeta(40) and Abeta(42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 31:357–367
- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM (2000) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2892–2897
- Hughes CP, Berg L, Danzger WL (1982) A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry* 140:566–572
- Humpel C (2011) Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends Biotechnol* 29:26–32
- Iacono D, O'Brien R, Resnick SM, Zonderman AB, Pletnikova O, Rudow G, An Y, West MJ, Crain B, Troncoso JC (2008) Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:578–589
- Ikonomic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, Wu J, Mathis CA, Scheff SW, Mufson EJ, DeKosky ST (2011) Precuneus amyloid burden is associated with reduced cholinergic activity in Alzheimer disease. *Neurology* 77:39–47
- Ingelsson M, Fukamoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC (2004) Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62:925–931
- Innocenti GM (1986) General organization of callosal connections in the cerebral cortex. In: Jones EG, Peters A (eds) *Cerebral cortex*, vol 5. Plenum Press, New York, pp 291–354
- Jelic V, Julin P, Shigeta M, Nordberg A, Lannfelt L, Winblad B, Wahlund LO (1997) Apolipoprotein E epsilon4 allele decreases functional connectivity in Alzheimer's disease as measured by EEG coherence. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63:59–65
- Johnson JD, Suzuki M, Rugg MD (2013) Recollection, familiarity, and content-sensitivity in lateral parietal cortex: a high-resolution fMRI study. *Front Hum Neurosci* 7:219
- Knyazeva MG, Carmeli C, Khadivi A, Ghika J, Meuli R, Frackowiak RS (2013) Evolution of source EEG synchronization in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34:694–705
- Koeda T, Knyazeva M, Njokiktjien C, Jonkman EJ, De Sonnevile L, Vildavsky V (1995) The EEG in acallosal children. Coherence values in the resting state: left hemisphere compensatory mechanism? *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 95:397–407
- Koenig T, Prichep L, Dierks T, Hubl D, Wahlund LO, John ER, Jelic V (2005) Decreased EEG synchronization in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 26:165–171
- Koyama A, Okereke OI, Yang T, Blacker D, Selkoe DJ, Grodstein F (2012) Plasma amyloid- β as a predictor of dementia and cognitive decline: a systematic review and meta-analysis. *Arch Neurol* 69:824–831
- Kramer G, van der Flier WM, de Langen C, Blankenstein MA, Scheltens P, Stam CJ (2008) EEG functional connectivity and ApoE genotype in Alzheimer's disease and controls. *Clin Neurophysiol* 119:2727–2732
- Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J, Varela FJ (1999) Measuring phase synchrony in brain signals. *Hum Brain Mapp* 8:194–208
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:796–807
- Lehtovirta M, Partanen J, Könönen M, Hiltunen J, Helisalmi S, Hartikainen P, Riekkinen P Sr, Soininen H (2000) A longitudinal quantitative EEG study of Alzheimer's disease: relation to apolipoprotein E polymorphism. *Dement Geriatr Cogn Disord* 11:29–35
- Liang P, Wang Z, Yang Y, Li K (2012) Three subsystems of the inferior parietal cortex are differently affected in mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 30:475–487
- Livneh Y, Mizrahi A (2011) Experience-dependent plasticity of mature adult-born neurons. *Nat Neurosci* 15:26–28
- Lobo A, Escoba V, Exquerra J, Sevar Díaz A (1979) Mini-Examen Cognoscitivo: un test sencillo, práctico, para detectar alteraciones intelectuales en pacientes psiquiátricos. *Actas Luso Esp Neurol Psiquiatr Cienc Afines* 3:189–202
- Lopes Da Silva FH, Storm Van Leeuwen W (1977) The cortical source of the alpha rhythm. *Neurosci Lett* 6:237–241
- Lopes da Silva F, Van Rotterdam A (1993) Biophysical aspects of EEG and magnetoencephalogram generation. In: Niedermeyer E, Lopes da Silva FH (eds) *Electroencephalography. Basic principles, clinical applications and related fields*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 78–91
- Lui JK, Laws SM, Li QX, Villemagne VL, Ames D, Brown B, Bush AI, De Ruyck K, Dromey J, Ellis KA, Faux NG, Foster J, Fowler C, Gupta V, Hudson P, Laughton K, Masters CL, Pertile K, Rembach A, Rimajova M, Rodrigues M, Rowe CC, Rumble R, Szoek C, Taddei K, Taddei T, Trounson B, Ward V, Martins RN, AIBL Research Group (2010) Plasma amyloid-beta as a biomarker in Alzheimer's disease: the AIBL study of aging. *J Alzheimers Dis* 20:1233–1242

Cerebral and blood correlates of reduced functional connectivity in mild cognitive impairment

Gabriel Gonzalez-Escamilla · Mercedes Atienza ·
David Garcia-Solis · Jose L. Cantero

Received: 6 July 2014 / Accepted: 23 October 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Growing evidence suggests that decreased functional connectivity in cortical networks precedes clinical stages of Alzheimer's disease (AD), although our knowledge about cerebral and biological correlates of this phenomenon is limited. To shed light on this issue, we have investigated whether resting-state oscillatory connectivity patterns in healthy older (HO) and amnesic mild cognitive impairment (aMCI) subjects are related to anatomical grey matter (GM) and functional (2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG)-PET) changes of neuroelectric sources of alpha rhythms, and/or to changes in plasma amyloid-beta ($A\beta$) and serum lipid levels, blood markers tied to AD pathogenesis and aging-related cognitive decline. We found that aMCI subjects showed decreased levels of cortical connectivity, reduced FDG-PET intake of the precuneus, and GM atrophy of the thalamus, together with higher levels of $A\beta$ and apolipoprotein B (ApoB) compared to HO. Interestingly, levels of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol were positively correlated with the strength of neural-phase coupling in aMCI subjects, and increased triglycerides accompanied bilateral GM loss in the precuneus of aMCI subjects. Together, these findings provide peripheral blood correlates of reduced resting-state cortical connectivity in aMCI, supported by anatomo-functional changes in cerebral sources of alpha rhythms.

This framework constitutes an integrated approach to assess functional changes in cortical networks through neuroimaging and peripheral blood markers during early stages of neurodegeneration.

Keywords Functional connectivity · Resting-state cortical networks · Alpha rhythm · Grey matter · FDG-PET · Mild cognitive impairment · Plasma amyloid-beta · Lipid markers · Cholesterol

Introduction


Aging is characterized by morphological changes in neurons, synaptic loss, and alterations in neurotransmitter receptors (Masliah et al. 1993; Hof and Morrison 2004; Bishop et al. 2010). $A\beta$ neuritic plaques and neurofibrillary tangles are also present in clinically intact older adults showing the same or different distribution as in Alzheimer's disease (AD) patients (Tomlinson et al. 1968; Katzman et al. 1988; Price et al. 1991), although age-related tangle formation does not by itself represent a process that would inevitably progress to AD (Price and Morris 1999). Therefore, the different degree of resistance to AD neuropathology (Snowdon 2003) together with the heterogeneity of clinical outcomes in individuals with comparable degrees of pathologic brain lesions (Iacono et al. 2009) illustrate the complexity of the aging process and foresees major obstacles to establish biological boundaries between normal aging and incipient neurodegeneration.

Synaptic dysfunctions and neuronal loss are two major pathological hallmarks of AD (DeKosky and Scheff 1990; Terry et al. 1991). Mounting evidence has shown that increased brain levels of soluble $A\beta$ oligomers are linked to

G. Gonzalez-Escamilla · M. Atienza · J. L. Cantero (✉)
Laboratory of Functional Neuroscience, Spanish Network of Excellence for Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Pablo de Olavide University,
Ctra. de Utrera Km 1, 41013 Seville, Spain
e-mail: jlcantor@upo.es

D. Garcia-Solis
Department of Nuclear Medicine, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain

Published online: 01 November 2014

 Springer

synaptic damage in AD (Lambert et al. 1998; Mucke et al. 2000; Walsh et al. 2002; Lesné et al. 2006; Lacor et al. 2007), likely accounting for disruption of neural circuits (Hsia et al. 1999; Palop et al. 2007; Cao et al. 2012; Cheng et al. 2013) and aberrant connectivity patterns in distributed brain networks during disease progression (Babiloni et al. 2004; Greicius et al. 2004; Stam et al. 2006; Brier et al. 2012).

Alpha oscillations are intrinsically generated by pyramidal neurons of cortical layer 5 (Silva et al. 1991), which are affected by dense-core plaques in AD patients (Arnold et al. 1991). The thalamus, that also plays an important role in the generation of the alpha rhythm (Lopes da Silva 1991; Hughes et al. 2004), has shown modest A β deposits and neurofibrillary tangles in AD patients (Rudelli et al. 1984; Masliah et al. 1989; Braak and Braak 1991). However, it remains to be elucidated whether impaired functional connectivity of resting-state cortical networks is accompanied by anatomo-functional damage of cortical and thalamic sources of EEG-alpha rhythms in amnesic mild cognitive impairment (aMCI) subjects.

Up to now, neither A β nor lipid concentration in blood have been confirmed as reliable AD biomarkers. However, the plasma A β_{1-42} /A β_{1-40} ratio predicts cognitive decline and AD progression (Koyama et al. 2012) as well as volume changes in the medial temporal lobe of healthy older (HO) subjects (Sun et al. 2011). Animal evidence also supports a link between alterations in lipid metabolism and AD pathogenesis (Pappolla et al. 2003; Shobab et al. 2005; Panza et al. 2006; Ghribi 2008; Martins et al. 2009; Di Paolo and Kim 2011), suggesting that elevated levels of cholesterol might contribute to accelerate AD progression (Simons et al. 1998; Grimm et al. 2008; Xiong et al. 2008) and to increase the risk for brain lesions and dementia (Leritz et al. 2011; Williams et al. 2013). However, no studies to date have investigated whether blood levels of A β and/or lipids are related to changes in the resting-state functional anatomy of the brain in aMCI subjects.

The purpose of the present study is therefore twofold: to investigate whether connectivity failures observed in aMCI are related to changes in grey matter (GM) and/or glucose consumption of the main neuroelectric sources of EEG-alpha rhythms; and to assess whether patterns of cortical connectivity are differently associated with changes in A β and lipid levels in HO and aMCI subjects.

Materials and methods

Subjects

Twenty-nine older adults with aMCI (10 females, mean age: 70.1 ± 6.8 years) and 26 HO subjects (15 females, mean

age: 66.5 ± 4.9 years) were enrolled in the study. Participants were primarily recruited from older people's associations, normal community health screening, and hospital outpatient services. All of them gave written informed consent prior to experiments. Approval for the study was obtained from the Human Research Ethics Committee of the University Pablo de Olavide in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki.

Each participant underwent structured, uniform evaluation that included a medical history, neurological examination, and cognitive function testing. Only those who met established criteria (see below) were included in the study. Cerebral magnetic resonance imaging (MRI) was previously examined in all participants to rule out territorial cerebral infarctions, brain tumors, hippocampal sclerosis, and/or vascular malformations. Those subjects with large periventricular and/or deep white matter (WM) lesions, revealed by scores ≥ 2 on the Fazekas ischemic scale (Fazekas et al. 1987), were excluded from the study. Cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes, overweight, family history of coronary heart disease or stroke) were also exclusion criteria.

aMCI subjects showed an idiopathic amnesic disorder with absence of impairment in cognitive areas other than memory, and they further met diagnostic criteria for aMCI (Petersen et al. 1999): (1) subjective memory complaints corroborated by the informant; (2) objective memory loss confirmed by the Spanish version of the Logical Memory subtest extracted from the Wechsler Memory Scale-Third Edition (WMS-III) (scorings 1.5 standard deviations below the age-appropriate mean); (3) global score of 0.5 (questionable dementia) in the clinical dementia rating (CDR); (4) normal independence function; and (5) no DSM-IV criteria for dementia. The global cognitive status was assessed with the Mini Mental State Examination (MMSE), adapted and validated for Spanish population (Blesa et al. 2001). A neurologist with long-standing experience in the diagnosis and treatment of dementia made the diagnosis of aMCI and ruled out any medical or neurological conditions in HO subjects. The diagnosis was further supported by results derived from a comprehensive neuropsychological battery: Boston Naming Test, Trail Making Test, Rey-Osterrieth Complex Figure Test, Visual Object and Space Perception Battery, verbal fluency and word list (Wechsler Memory Scale). The absence of secondary causes of cognitive deficits was confirmed by laboratory tests including complete blood count, vitamin B12/folate, and thyroid function tests. Elderly depression was excluded using the shorter version of the Geriatric Depression Scale (Yesavage et al. 1983). None of the participants were taking cholinesterase inhibitors, and/or psychiatric medication at the time of recruiting or during the study.

Inclusion criteria for HO subjects were (1) absence of cognitive impairment (memory, language, attention, and

executive function) confirmed by neuropsychological assessment, (2) CDR global score of 0 (no dementia), and (3) normal independent function. HO subjects were tested following the same neuropsychological protocol as for aMCI subjects.

APOE genotyping

Genomic DNA was isolated from blood using a salting-out protocol (Miller et al. 1988), and ApoE polymorphisms were determined with pre-designed TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystem). The presence/absence of the ApoE $\epsilon 4$ allele was not employed as an inclusion criterion during the recruiting process.

Blood A β and lipid levels

Venous blood samples were obtained after overnight fasting. Blood samples were collected in 10 mL K2-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) coated tubes (BD Diagnostics), and further centrifuged (3,500 rpm) at 4 °C for 5 min. Supernatant plasma was collected and aliquoted into 250- μ L polypropylene tubes containing 8.32 μ L of a protease inhibitor cocktail (cOmplete Ultra Tablets mini, Roche). Plasma samples were stored at -80 °C and thawed immediately before assay.

Plasma A β levels were measured blind to cognitive status in duplicate samples (50 μ L) according to manufacturer's instructions (Invitrogen). Averaged values (pg/ml) were used for statistical analyses. Human A β_{1-40} and ultra sensitive A β_{1-42} specific enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits were used for this purpose. The detection limit of these assays was 0.52 pg/ml for A β_{1-40} and 0.27 pg/ml for A β_{1-42} . Both inter-assay and intra-assay coefficients of variation were below 10 %. The A β_{1-42} /A β_{1-40} ratio was additionally computed for each subject given its ability to identify cognitively normal subjects who are at increased risk of developing MCI or AD (Graff-Radford et al. 2007), and its association with cognitive decline (Koyama et al. 2012) and with volume loss of the medial temporal lobe in HO adults (Sun et al. 2011).

Fasting serum levels of total cholesterol (TCh), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), triglycerides (TRIG), and apolipoprotein B (ApoB) were obtained in each participant with the automated A15 Random Access Analyzer® (Biosystems S.A., Barcelona, Spain) using Biosystems commercial test kits.

EEG recordings and signal preprocessing

EEG recordings were obtained from 59 scalp electrodes referenced to linked-mastoids, and positioned according to the extended International 10–10 system. Additional

electrodes were placed for monitoring vertical–horizontal eye movements and the muscular tone. Continuous EEG recordings were performed in resting state with eyes closed for 10 min between 9 and 10 AM. Electrophysiological measurements were amplified (BrainAmp MR, Brain Vision®), filtered (0.1–100 Hz bandpass), digitized (250 Hz, 16-bit resolution), and stored in digital format for subsequent analyses.

EEG epochs were transformed into the common average reference to partially avoid pernicious effects of reference on neural-phase synchrony results (Schiff 2005). Ocular and muscle artifacts were removed by applying Independent Component Analysis (Infomax algorithm), as implemented in the BrainVision Analyzer software v. 1.05 (Brain Products® GmbH). Epochs with noisy EEG channels were manually selected and excluded from further analysis to avoid artificial coupling patterns across electrodes. Quality of EEG recordings was apparently similar in HO and aMCI subjects precluding group effects in functional connectivity due to this factor.

Artifact-free EEG epochs from each participant were filtered within the alpha band (7.5–12.5 Hz), and the alpha peak frequency, defined as the maximum value of spectral power within the alpha band, was computed for each subject. Finally, artifact-free EEG epochs were bandpass filtered within the alpha peak frequency ± 0.5 Hz (Kaiser window, filter order: 1326th, frequency attenuation: 0.5 Hz).

Determining neural-phase coupling in resting-state cortical networks

We calculated instantaneous phases with the Hilbert transform. Neural-phase coupling between pair-wise combinations of scalp EEG signals was computed using the phase lag index (PLI, Stam et al. 2007):

$$PLI = | \langle \text{sign}[\Delta\phi(t_k)] \rangle |$$

where $\Delta\phi(t_k)$ represents the phase difference between the two EEG signals in the time sample t_k . The PLI quantifies how consistently one EEG signal is phase leading or lagging another EEG signal across time, disregarding zero-lag phase differences mainly due to volume conduction and/or active reference electrodes. PLI values range from 0 (no phase coupling) to 1 (perfect phase locking). The first 7 artifact-free EEG epochs of 8-s length were automatically selected in each participant. For each pair of scalp EEG electrodes and subject, we obtained a PLI value that resulted from averaging PLIs computed for each of the artifact-free EEG epochs. The same procedure was applied to surrogate data (see below).

To obtain functional connectivity patterns between EEG signals in each group, electrodes were previously grouped into four regions of interest (ROIs) for the left hemisphere

(frontal ROI: F7, F5, F3, F1, FC5, FC3, FC1; temporal ROI: FT7, T7, TP7; parietal ROI: Cp5, CP3, Cp1, P7, P5, P3, P1; and occipital ROI: PO7, PO3, O1) and their homologous ROIs for the right hemisphere. Electrodes placed in the midline were removed from further analyses together with other EEG locations commonly affected by muscular and oculomotor artifacts. PLIs were computed within each ROI as well as between ROIs, for the same hemisphere or between left and right hemispheres. Overall, we computed 780 PLIs for each subject: 380 PLIs within the same hemisphere and 400 PLIs between different hemispheres.

Cerebral MRI acquisition and image preprocessing

Structural cerebral images were acquired on a whole-body Philips Achieva 3T MRI scanner, using an 8-channel head array coil. A high-resolution MP-RAGE (magnetization-prepared rapid gradient echo) T1-weighted cerebral scan was obtained in each participant. Acquisition parameters were empirically optimized for GM/WM contrast (repetition-time = 2,300 ms, echo-time = 4.5 ms, flip angle = 88, matrix dimensions 256×192 , 184 contiguous sagittal 1.2 mm thick slices, time per acquisition = 5.4 min).

Cerebral MRIs were visually inspected for artifacts (e.g., excessive blurring due to head motion, poor GM/WM contrast), and those brain scans with poor quality were repeated within the same week. Structural brain images were processed and analyzed with an optimized voxel-based morphometry (VBM) procedure implemented in SPM8 (www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm). Briefly, T1 cerebral images on native space were partitioned into GM, WM and cerebrospinal fluid (CSF). GM and WM maps were then registered to the Montreal Neurological Institute canonical brain (MNI152) using DARTEL, a fast diffeomorphic image registration algorithm that minimizes anatomical variations among subjects preserving topology (Ashburner 2007). Resultant cerebral images were resampled to 1.5 mm^3 isotropic voxel size. To maintain total GM within the normalized compartments, GM maps were multiplied by relative volumes of warped and unwarped structures derived from the non-linear step of spatial normalization (Jacobian determinants) (Ashburner and Friston 2000). Resultant non-linear modulated warped GM maps were finally smoothed with an isotropic Gaussian kernel of 16 mm.

FDG-PET acquisition and image preprocessing

FDG-PET cerebral images were acquired on a whole-body PET-TAC Siemens Biograph 16 HiREZ scanner (Siemens Medical Systems, Germany) with in-plane and axial resolution of 4.2 and 4.5 mm full-width at half maximum (FWHM), respectively. Subjects fasted for at least 8 h

before PET examination. Intravenous lines were placed 10–15 min before tracer injection of a mean dose of 370 MBq of 2-[^{18}F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG). Participants stayed in a dimly lit room with their eyes closed to minimize external stimuli during the FDG uptake period. PET scans lasted approximately 30 min. A transmission scan was used for attenuation correction, and FDG-PET cerebral images were reconstructed with $2.6 \times 2.6 \times 2 \text{ mm}$ voxel resolution using standard 2D back-projection filters. We applied partial volume correction (PVC) to cerebral FDG-PET cerebral images with the algorithm implemented in the PMOD software v3.17 (<http://www.pmod.com>) (Giovacchini et al. 2004).

Absolute values of PVC-FDG cerebral images were normalized to the mean cerebellar glucose consumption using the native brain space of each participant. Next, individual PVC-FDG images normalized to the cerebellum were registered with DARTEL to the MNI152 brain space by applying normalization parameters (deformation fields) previously obtained for cerebral MRI. Modulated warped maps of cerebral glucose consumption were finally smoothed with an isotropic Gaussian kernel of 16 mm.

Obtaining anatomical masks of cerebral sources of EEG-alpha rhythm

Evidence suggests that neuroelectric sources of the human alpha rhythm are located in the cuneus (occipital cortex), precuneus (superior parietal lobe) and thalamus (Cantero et al. 2009a, b). Therefore, all VBM analyses (MRI and FDG-PET) performed in the current study were limited to these ROIs.

Anatomical delimitation of EEG-alpha cerebral sources was obtained with the automated segmentation method implemented in Freesurfer v5.1 (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>). First, manual edits were introduced in individual brain segmentations until the output was deemed acceptable upon visual inspection. Next, anatomical volume masks of EEG-alpha cerebral sources obtained from each subject were transformed into the same spherical coordinate system and further resampled to the spherical average surface of the study population (Fischl et al. 1999a, b). A transformation matrix was computed to convert average space coordinates of previously segmented alpha cerebral sources into the MNI152 brain space (resampled to 1.5 mm^3 isotropic voxel size), allowing us to perform voxel-wise group analysis with anatomo-functional (GM and glucose consumption) masks of EEG-alpha cerebral sources in the same brain space.

Statistical analyses

We previously assessed the normality assumption of data distribution with the Kolmogorov–Smirnov test. All

demographics, cognitive, and plasma A β /serum lipid values were normally distributed, allowing us to apply parametric statistical tests.

Group differences in demographic and cognitive variables were assessed with unpaired *t* tests, whereas the influence of gender and ApoE ϵ 4 was tested with the Chi-square test due to the categorical nature of these variables. Group differences in blood A β (A β _{1–40}, A β _{1–42}, A β _{1–42}/A β _{1–40} ratio) and lipid levels (TCh, LDL, HDL, TRIG, ApoB) were assessed using different analyses of covariance (ANCOVA) adjusted for age and gender. All these analyses were performed with SPSS v. 15 (SPSS Inc. Chicago, IL).

A bootstrap method was employed to determine if PLI values were significantly above noise and, consequently, had physiological meaning (Lachaux et al. 1999). For each pair of scalp EEG signals, we generated 2,000 surrogate data by adding a temporal shift (a random lag between 4 and 8 s) in one of the two EEG signals originally used to compute the PLI. Surrogate data was then used to compute distribution of 2,000 PLI values for each pair of EEG signals. The PLI value corresponding to the 95th quantile of the surrogate distribution was chosen as the significance threshold. Original PLIs obtained in each group were compared to the thresholded surrogate-PLIs using the Wilcoxon–Mann–Whitney test (Pereda et al. 2005). Only those PLIs that reached statistical significance ($p < 0.05$) in at least one of the two groups (HO and/or aMCI; aMCI ϵ 4 carriers and/or non-carriers) were selected for further analyses.

Next, we determined group differences for each significant PLI. To aim this goal, significant PLIs were permuted by randomly assigning a number of HO subjects to the aMCI group. We computed the T^2 statistic on each permutation ($n = 2,000$) using the maximum squared T statistic ($\max T^2$) for each PLI, and the 95th quantile of this $\max T^2$ distribution as statistical threshold. This procedure is aimed at controlling the family-wise error (FWE) rate for all pairs of electrodes jointly (Maris 2004). Only those PLI values that reached significant group differences ($p < 0.05$, FWE corrected) were reported in the current study, and they were next used for correlations with GM volume and glucose consumption of cerebral sources of alpha rhythms.

Group differences in GM volume/glucose consumption of alpha cerebral sources (cuneus, precuneus, and thalamus) were assessed using the modulated VBM approach implemented in SPM8 (ANCOVA with age, gender, and either GM volume or glucose consumption of alpha cerebral sources as covariates, $p < 0.05$ FWE corrected).

Voxel-wise linear regression analyses were performed to test for relationships between anatomical (GM)/functional (FDG-PET) changes in neural sources of EEG-alpha rhythms and patterns of resting-state EEG coupling. These analyses included group (HO versus aMCI; aMCI ϵ 4

carriers versus non-carriers), age, gender, GM volume/glucose consumption of alpha cerebral sources, and PLI as regressors. Regression analyses were separately performed for each significant PLI (Z-score transformed). PLIs were split into two groups to test for group differences (*T*-contrasts) in the way that PLI changes correlated with variations in GM volume/glucose consumption of alpha cerebral sources ($p < 0.05$, FWE corrected). Regression slopes were compared when correlations reached statistical significance in at least one of the two groups. A similar statistical approach was employed to study relationships between GM volume/glucose consumption of alpha cerebral sources and plasma A β /serum lipid levels.

Further regression analyses were performed to test for associations between plasma A β /serum lipid levels and patterns of resting-state cortical connectivity. If at least one of the two groups reached significance, differences between regression slopes were further assessed. These regression analyses were also adjusted for age and gender.

Results

Demographics, cognitive profile, and ApoE4 genotype

Table 1 includes demographic characteristics and cognitive profile for each group. As expected, subjects with aMCI showed significantly lower scores in MMSE ($p < 0.01$), immediate ($p < 10^{-6}$) and delayed verbal memory ($p < 10^{-10}$) than the HO individuals. The ApoE4 genotype was approximately fourfold higher in aMCI (48.3 %) than in HO subjects (11.5 %). The ϵ 2/ ϵ 4 polymorphism was present in only one aMCI subject. aMCI ApoE4 carriers and non-carriers showed similar demographic and cognitive profiles, with the exception of impaired immediate memory ($p < 0.03$) and a trend toward significance in delayed recall of aMCI ApoE4 carriers ($p < 0.07$).

Group differences in A β and lipid levels

Table 2 shows mean values of plasma A β and serum lipid levels for each group. Overall, A β levels significantly differed between the two groups ($F_{3,49} = 5.2$, $p = 0.003$). Post hoc analyses revealed that aMCI showed higher concentrations of A β _{1–40} ($p = 0.01$) and A β _{1–42} ($p = 0.001$) than HO subjects, whereas group differences in the A β _{1–42}/A β _{1–40} ratio did not reach significance.

The MANCOVA revealed that serum lipid levels were significantly different between the two groups ($F_{5,47} = 2.48$, $p < 0.04$), although only ApoB showed significant increased levels in aMCI compared to HO subjects ($p = 0.05$). aMCI ApoE4 carriers and non-carriers

Table 1 Demographics, cognitive profile, and ApoE $\epsilon 4$ distribution

	HO	aMCI	$p <$	aMCI $\epsilon 4^-$	aMCI $\epsilon 4^+$	P
Age (years)	66.5 \pm 4.9	70.2 \pm 6.8	0.08	68.6 \pm 7.1	71.8 \pm 6.2	0.2
Gender (F/M)	15/11	10/19	0.09	3/12	7/7	0.09
Education (years)	8.6 \pm 4.3	8.2 \pm 5.4	0.8	7.7 \pm 5.2	8.8 \pm 5.7	0.6
CDR (sum of boxes)	0	0.5	N/A	0.5	0.5	N/A
MMSE	28.3 \pm 1.3	26.8 \pm 2.6	0.01*	27.5 \pm 2.6	26.0 \pm 2.5	0.1
Immediate recall	14.2 \pm 3.1	9.2 \pm 2.9	10 ^{-6*}	10.3 \pm 2.7	8.0 \pm 2.7	0.03*
Delayed recall	13.2 \pm 2.9	5.6 \pm 3.7	10 ^{-10*}	6.8 \pm 3.9	4.3 \pm 3.2	0.07
TMT						
TMT-A (s)	49.7 \pm 27	53.4 \pm 33	0.7	50.1 \pm 21	55.2 \pm 30	0.7
TMT-B (s)	109 \pm 46	125 \pm 51.5	0.5	120 \pm 11	129 \pm 29	0.6
VOSP						
Screening	20	19.9 \pm 0.2	0.9	19.6 \pm 0.1	19.8 \pm 0.4	0.9
Incomplete letters	19.4 \pm 0.6	19.3 \pm 0.9	0.9	19 \pm 0.5	19.6 \pm 0.6	0.7
Silhouettes	19.4 \pm 0.6	17.5 \pm 4.6	0.4	18.5 \pm 1.3	19.5 \pm 3.8	0.5
Object decision	15.5 \pm 2.6	13.8 \pm 6	0.5	14.8 \pm 2.1	15.8 \pm 2.5	0.3
Progress. silhouettes	11.71 \pm 2.4	10.3 \pm 8.1	0.8	10.9 \pm 3.1	9.7 \pm 2.8	0.4
Dot counting	9.9 \pm 0.7	9.9 \pm 0.2	0.9	9.7 \pm 0.1	9.8 \pm 0.1	0.8
Posit. discrimination	19.7 \pm 1.8	18.6 \pm 2	0.6	18.9 \pm 0.5	18.3 \pm 0.8	0.8
Number location	8.69 \pm 1.6	8.3 \pm 1.6	0.8	8.1 \pm 2.1	8.5 \pm 0.9	0.6
Cube analysis	8.6 \pm 1.9	7.2 \pm 2.7	0.2	7.6 \pm 1.8	6.9 \pm 2.3	0.4

Results are expressed as mean \pm standard deviation
CDR clinical dementia rating, *CDR* = 0 no dementia, *CDR* = 0.5 questionable or very mild dementia. *MMSE* mini-mental state examination; *TMT* Trail Making Test, forms A and B; *VOSP* Visual object and space perception battery; *F/M* female/male; $\epsilon 4^-$ ApoE $\epsilon 4$ non-carriers; $\epsilon 4^+$ ApoE $\epsilon 4$ carriers
 P exact p value. Significant P values were marked with an asterisk. N/A (not applicable)

Table 2 A β and serum lipid levels

Biological markers	HO	aMCI	P
A β_{1-40} (pg/ml)	60.5 \pm 5.4	80.6 \pm 6.1	0.01*
A β_{1-42} (pg/ml)	3.8 \pm 0.3	5.9 \pm 0.5	0.001*
A β_{1-42} /A β_{1-40}	0.08 \pm 0.01	0.07 \pm 0.006	0.7
Total cholesterol (mg/dL)	202.3 \pm 7.4	210.1 \pm 7.5	0.5
LDL cholesterol (mg/dL)	112.3 \pm 5.9	112.5 \pm 5.7	0.9
HDL cholesterol (mg/dL)	49 \pm 2.6	46.9 \pm 2.4	0.9
Triglycerides (mg/dL)	121.9 \pm 8.5	123 \pm 8.2	0.9
ApoB (mg/dL)	110.3 \pm 4.1	126 \pm 7.8	0.050*

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean

A β amyloid-beta, *LDL* low-density lipoprotein, *HDL* high-density lipoprotein, *ApoB* Apolipoprotein B

P exact p value of post hoc analysis, after significant MANCOVA. Significant P values were marked with an asterisk

did not show significant differences either in plasma A β or serum lipid levels.

Group differences in resting-state alpha-phase coupling

Figure 1 illustrates differences in alpha-phase coupling between HO and aMCI subjects (left column), and between aMCI ApoE4 carriers and non-carriers (right column). The

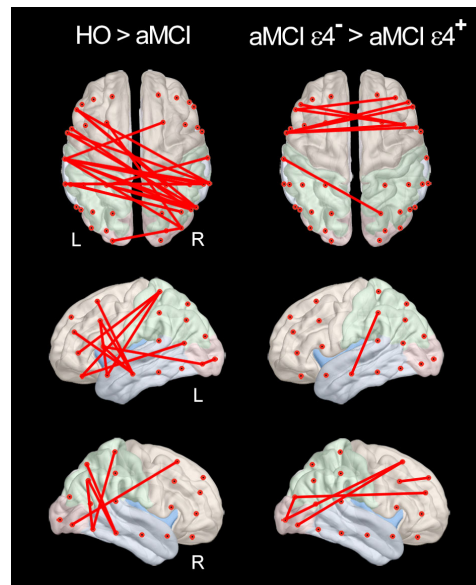
**Fig. 1** Group differences in alpha-phase coupling between HO and aMCI subjects (left column), and between aMCI ApoE4 carriers and non-carriers (right column). *L* left hemisphere; *R* right hemisphere

Table 3 Group differences in GM and glucose consumption of EEG-alpha generators

EEG-alpha source	CS	x	y	z	T_{49}	P
GM (HO > aMCI)						
R thalamus	1,603	21	-16	-5	5.20	0.001
L thalamus	471	-23	-22	-5	5.31	0.001
FDG-PET (HO > aMCI)						
R precuneus	4,321	9	-61	40	6.31	10^{-4}
L thalamus	154	-14	-16	3	4.27	0.02
R precuneus	45	-17	-45	67	4.24	0.02
L precuneus	24	-2	-39	34	4.42	0.01

GM grey matter, FDG-PET glucose consumption, CS cluster size (in mm^3). L left, R right. Coordinates (x-y-z) are in the MNI152 brain anatomical space. T values (degrees of freedom in the subscript)

P exact p value corresponding to group comparison (FWE corrected, age and gender as covariates)

aMCI group showed decreased levels of neural synchrony ($p < 0.05$, FWE corrected) in 41 of 780 PLIs (5.25 %), no significant results were found in the opposite direction (i.e., aMCI > HO). More than half (51.2 %) of the above significant differences affected functional coupling between left and right hemispheres, whereas 29.2 and 19.5 % of significant differences were restricted to the left and right hemispheres, respectively (Fig. 1, left column). Significant group differences in neural-phase coupling mainly affected relationships between right parietal and left temporo-parietal regions, as well as functional connectivity within the right parietal lobe and between right parietal and right temporal regions. Therefore, the parietal lobe, mainly from the right hemisphere, was the cortical region that accounted for most of the resting-state connectivity failures showed by aMCI subjects.

aMCI ApoE4 carriers also presented a significant reduction of neural-phase coupling in 16 of 780 PLIs (2 %) compared to aMCI ApoE4 non-carriers. As illustrated in Fig. 1 (right column), reduced connectivity in aMCI ApoE4 carriers mainly affected communication between regions of the frontal lobe, and regions of the right frontal and parieto-occipital cortex.

Group differences in GM and glucose consumption of cerebral sources of EEG-alpha rhythm

Table 3 summarizes group differences in GM and glucose consumption (FDG-PET) of cerebral sources involved in the generation of the alpha rhythm ($p < 0.05$, FWE corrected). Figure 2 displays these changes (top panel: GM; bottom panel: FDG-PET) on a volume rendering of cerebral MRI. Briefly, aMCI subjects showed volume reductions of the thalamus, those in the right hemisphere being more accentuated. We further found significant hypometabolism in bilateral regions of the precuneus, and the left

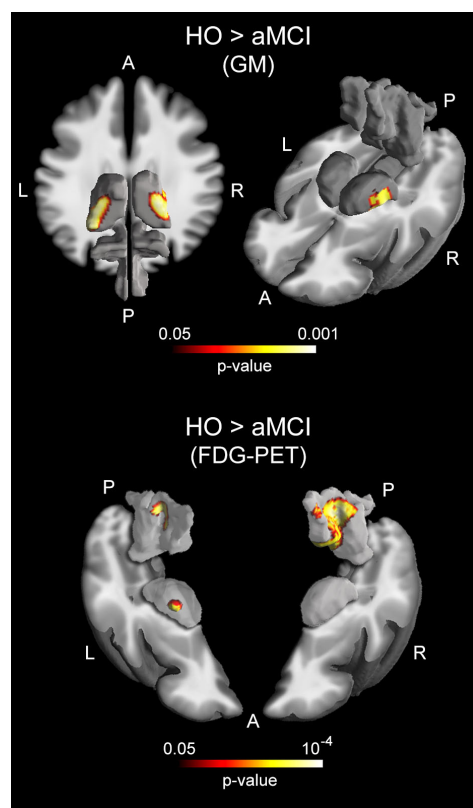


Fig. 2 Group differences in GM and glucose consumption of cerebral regions involved in the generation of alpha rhythms ($p < 0.05$; controlled for FWE). *Upper panel:* GM changes restricted to bilateral regions of the thalamus. *Bottom panel:* FDG-PET changes restricted to bilateral regions of the precuneus and left thalamus. A anterior, P posterior, L left; R right

thalamus. No significant differences in GM or glucose consumption were found when comparing aMCI ApoE4 carriers with non-carriers.

Relationship between changes in GM/glucose consumption of EEG-alpha sources and neural-phase coupling

We further investigated whether changes in resting-state alpha connectivity patterns were related to variations in GM/glucose consumption of EEG-alpha sources in HO and aMCI subjects, separately. These analyses revealed positive correlations between GM of the right thalamus and inter-hemispheric coupling of fronto-occipital regions restricted only in HO subjects ($p < 0.02$). Between-group

Table 4 Group differences in correlations between GM and FDG-PET changes in EEG-alpha sources and levels of alpha-phase coupling

Electrode pair	EEG-alpha generator	CS	x	y	z	r	P
GM							
IF-rO HO ⁺ > aMCI ⁻	R thalamus	18	26	-16	9	0.29	0.04
FDG-PET							
rP-rP HO ⁺ > aMCI ⁻	R precuneus	873	-5	-67	42	0.43	0.004
IT-rP HO ⁺ > aMCI ⁻	R precuneus	622	6	-49	25	0.39	0.01
rP-rP HO ⁺ > aMCI ⁻	R precuneus	208	0	-61	36	0.37	0.02

GM grey matter, FDG-PET glucose consumption, CS cluster size (in mm³). *l/l* left, *r/r* right. *F* frontal, *P* parietal, *T* temporal, *O* occipital. Coordinates (*x-y-z*) are in the MNI152 brain space
+/- Denotes the direction of correlations within each group, although only correlations for HO subjects reached significance. *r* Pearson correlation coefficient
P exact *p* value corresponding to between-group regression analyses (FWE-corrected, age and gender as covariates)

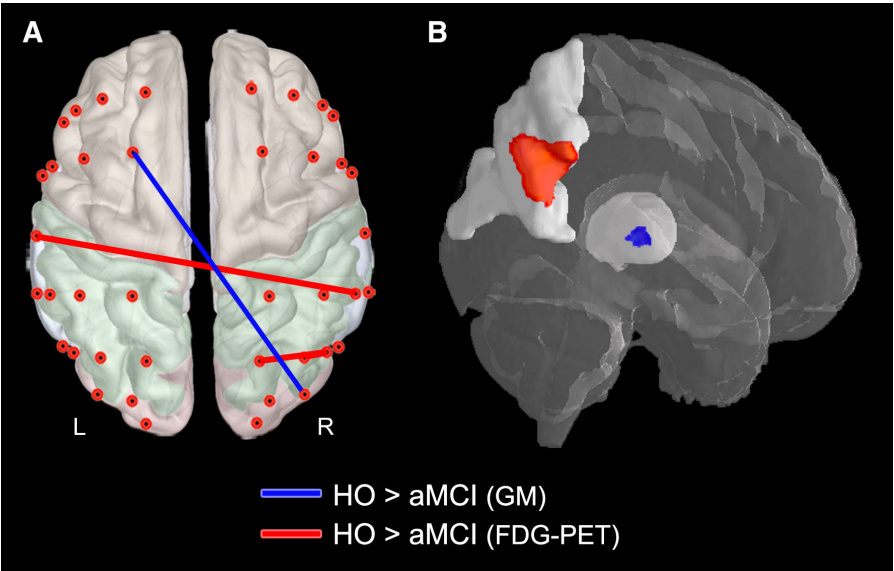


Fig. 3 Relationship between GM/glucose consumption of EEG-alpha cerebral sources and patterns of alpha-phase coupling ($p < 0.05$; controlled for FWE). **a** Cortico-cortical oscillatory coupling involved in significant correlations with GM and FDG-PET changes. **b** Anatomical location of significant correlations. Correlations with GM are represented in blue, whereas correlations with FDG-PET are displayed in red. *L* left hemisphere, *R* right hemisphere

regression slopes also differed significantly ($p < 0.04$). Additionally, we found positive correlations between glucose consumption of right parietal lobe and alpha coupling of right parietal regions in HO subjects ($0.02 < p < 0.03$). Analysis yielded significant differences when compared regression slopes of the two groups ($0.004 < p < 0.02$). Further information on group differences in regression slopes for correlations between neuroimaging changes and neuroelectric cortical coupling are shown in Table 4 and illustrated in Fig. 3.

No significant relationship between GM/glucose consumption and cortical alpha-phase coupling was found either in aMCI ApoE4 carriers or in non-carriers.

Relationship between changes in A β -lipid levels and alpha-phase coupling

We examined whether changes in cortical connectivity patterns underlying alpha rhythms were associated with peripheral A β -lipid levels in each group, separately.

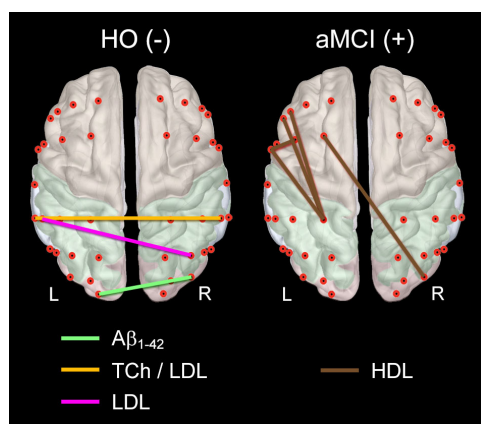


Fig. 4 Relationship between A β -lipid levels and alpha-phase coupling in HO (left panel) and aMCI subjects (right panel). Each significant biological marker was displayed in different color. Plus/minus denotes the direction of significant correlations in each group. A β_{1-42} amyloid-beta isoform 42, TCh total cholesterol, LDL low-density lipoprotein, HDL high-density lipoprotein. L left, R right

Results showed that decreased levels of A β_{1-42} ($r = -0.64$, $p < 0.001$), TCh ($r = -0.54$, $p < 0.005$) and LDL ($r = -0.57$, $p < 0.003$; $r = -0.47$, $p < 0.01$) accompanied enhanced inter-hemispheric functional connectivity in HO subjects, although group differences in regression slopes did not reach significance between the two groups. In aMCI subjects, significant correlations were restricted to positive correlations between HDL levels and alpha-phase coupling (r values ranged from 0.41 to 0.47, p values ranged from 0.02 to 0.01) mostly involving the left hemisphere. Comparison of regression slopes revealed significant higher correlations in aMCI than in HO subjects ($p < 0.01$). Figure 4 illustrates significant relationships between A β -serum lipid levels and resting-state alpha connectivity patterns in HO (all negative correlations) and aMCI subjects (all positive correlations).

No significant relationship between A β -lipid levels and alpha connectivity patterns were found either in aMCI ApoE4 carriers or in non-carriers.

Relationship between A β -lipid levels and GM/glucose consumption of EEG-alpha cerebral sources

Finally, we assessed whether A β and lipid levels were related to structural/functional changes in cerebral regions involved in the generation of the alpha rhythm. Regression analyses revealed a significant relationship between increased levels of triglycerides and decreased GM of precuneus only in aMCI (r values ranged from 0.5 to 0.57, p values ranged from 0.01 to 0.001). The analysis also yielded significant differences between the regression slopes of the two groups (Table 5; Fig. 5). No significant relationship was found between peripheral blood markers (A β or lipids) and glucose consumption either in HO or aMCI subjects. Neither did we find significant associations between A β -lipid levels and neuroimaging changes in either aMCI ApoE4 carriers or in non-carriers.

Discussion

In the present study, we have investigated whether changes in EEG-connectivity patterns underlying resting-state are accompanied by macroscopic changes (GM and glucose consumption) in cerebral sources of the alpha rhythm, as well as by changes in peripheral A β and lipid levels in HO and aMCI subjects. Results revealed that individuals with aMCI showed hypometabolism in the precuneus, GM atrophy in the thalamus, and enhanced levels of A β and ApoB. Contrary to the expected, most of these markers were significantly associated with the strength of neural-phase coupling observed in HO subjects, but not with impaired cortical synchronization proper of aMCI subjects, suggesting that synaptic destabilization associated with incipient neurodegeneration might lead to aberrant structural-functional relationships of alpha EEG sources.

Table 5 Group differences in correlations between triglycerides levels and FDG-PET changes in EEG-alpha sources

	EEG-alpha source	CS	x	y	z	r	P
FDG-PET							
HO ⁺ > aMCI ⁻	R precuneus	669	14	-75	49	0.6	2×10^{-5}
HO ⁺ > aMCI ⁻	L precuneus	332	-9	-76	54	0.5	0.002
HO ⁺ > aMCI ⁻	L precuneus	90	-17	-40	63	0.43	0.01

FDG-PET glucose consumption, CS cluster size (in mm³), L left, R right. Coordinates (x-y-z) are in the MNI152 brain anatomical space +/− Denotes the direction of correlations within each group, although only correlations for HO subjects reached significance. r Pearson correlation coefficient

P exact p value corresponding to between-group regression analyses (FWE-corrected, age and gender as covariates)

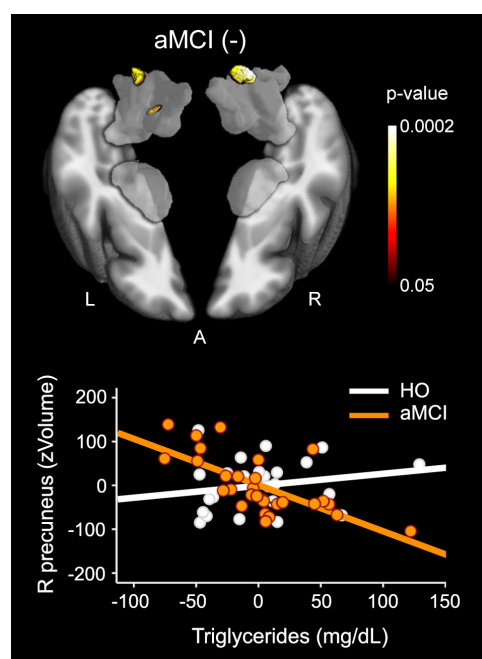


Fig. 5 Relationship between increased levels of triglycerides and decreased GM of precuneus in aMCI subjects ($p < 0.05$; controlled for FWE). Plus/minus denotes the direction of significant correlations in each group. *Upper panel:* anatomical location of significant correlations, restricted to bilateral regions of the precuneus. *Bottom panel:* scatter plot displaying relationships between GM loss of the right precuneus (Z-scored volume of the voxel reached maximum significance) and increased levels of triglycerides. Note that this relationship only reached significance in the aMCI group. A anterior, L left, R right

Interestingly, aMCI subjects showed a positive relationship between levels of HDL cholesterol and the strength of neural-phase coupling, leading to the hypothesis that high concentrations of HDL might have enhanced neuroprotector effects in aMCI. Together, these results provide the first evidence of cerebral and biological correlates of changes in neural oscillatory coupling in two different trajectories of aging.

Failures in resting-state cerebral networks reveal the unbalance between structure and function in aMCI

Synapse dysfunction, the major neurobiological correlate of cognitive impairment in AD (DeKosky and Scheff 1990; Terry et al. 1991), has shown to precede tangle formation and neuronal loss in MCI subjects (Masliah et al. 2001; Scheff et al. 2006). Most of the synaptic degeneration in

neocortex affects large pyramidal neurons of layers III and V, largely connected through cortico-cortical association fibers (Terry et al. 1981; Rogers and Morrison 1985; Hof et al. 1990). Consequently, and given that oscillatory EEG activity results from summated excitatory and inhibitory postsynaptic potentials primarily generated by synaptic activity of large pyramidal neurons in the cerebral cortex (Lopes da Silva and Van Rotterdam 1993), synaptic dysfunction occurring in aMCI subjects may be reflected in abnormal patterns of EEG coupling. Accordingly, resting-state EEG alpha rhythms not only are significantly different in aMCI when compared with HO subjects (Babiloni et al. 2006a; Cantero et al. 2009a), but they are also able to predict progressive cognitive deterioration (Babiloni et al. 2014) and stability of MCI status over time (Babiloni et al. 2011). However, up to now only a few studies have established a link between abnormalities of EEG rhythms and cortical atrophy in aMCI subjects (Babiloni et al. 2006b, 2013). The present study gives a step further in evaluating the link between failures in resting-state large-scale synchronization mechanisms and the anatomo-functional integrity of cerebral sources involved in the generation of alpha rhythms.

We showed structural and functional changes of the thalamus and precuneus in aMCI subjects, two regions considered canonical neuroelectric sources of EEG alpha rhythms (Cantero et al. 2009a, b). Accumulated evidence supports a complex relationship between the thalamus and neocortex during generation of alpha oscillations. For instance, increased glucose consumption of the thalamus is paralleled by increased amplitude of alpha oscillations over parieto-occipital regions (Goldman et al. 2002; Schreckenberger et al. 2004; Feige et al. 2005; De Munck et al. 2007). Furthermore, cortical and thalamic regions are highly coherent during generation of alpha waves (Lopes da Silva et al. 1973). Therefore, bilateral GM loss of thalamus characterizing our aMCI sample might account for impaired alpha connectivity between anterior and posterior regions of the brain, likely due to synaptic dysfunction or synaptic loss of thalamocortical neurons. This hypothesis is supported by studies showing amyloid deposits and neurofibrillary tangles in the thalamus of AD patients (Rudelli et al. 1984; Masliah et al. 1989; Braak and Braak 1991) together with significant GM loss (Karas et al. 2004) that further correlated with impaired cognitive functioning (de Jong et al. 2008), and by studies showing altered patterns of functional connectivity between thalamus and precuneus in aMCI subjects (Cantero et al. 2009a; Wang et al. 2012; Zhou et al. 2013).

The precuneus is a region of the superior parietal lobe also involved in EEG-alpha generation (Toth et al. 2007; Michels et al. 2008; Cantero et al. 2009a). An emerging

body of evidence suggests that this area is extremely vulnerable to the accumulation of A β plaques during the progression of AD (Rowe et al. 2007; Driscoll et al. 2012), which might account for disrupted connectivity with other brain regions in amyloid-positive MCI subjects (Drzezga et al. 2011), as well as for cognitive decline in preclinical AD patients (Nickl-Jockschat et al. 2012; Yotter et al. 2013).

Contrary to our initial hypothesis, neither GM loss in the thalamus nor hypometabolism in the precuneus were correlated with the strength of alpha phase synchrony in aMCI subjects. This relationship only emerged in HO adults. Aging-related changes in synaptic loss likely accounted for coherent relationships between structure and function in normal aging, whereas synaptic dysfunctions in aMCI might lead to the lack of significant associations between damage of cerebral sources of alpha rhythm and failures in EEG alpha coupling.

Relationship between peripheral blood markers and patterns of resting-state cortical connectivity in HO and aMCI

Searching for reliable peripheral blood markers of incipient neurodegeneration is increasingly important, given the invasive nature, potential side effects, and problematic follow-up analysis based on CSF sample collections. However, results derived from cross-sectional studies using plasma A β in MCI patients are largely inconsistent (Sobów et al. 2005; Blasko et al. 2008; Storace et al. 2010; Pesini et al. 2012), likely due to the instability of A β peptides in plasma (Humpel 2011), the state of aggregation (Storace et al. 2010), and the heterogeneity of MCI populations across studies. In agreement with our results, only those studies that specifically included MCI of an amnesic type have found higher plasma levels of A β_{1-42} compared to HO subjects (Storace et al. 2010; Sobów et al. 2005; Pesini et al. 2012). Although increased levels of plasma A β_{1-42} observed in aMCI subjects might be signalling a central pathogenic process of AD, e.g., deregulation of β -APP metabolism followed by brain A β accumulation, this hypothesis still requires experimental confirmation.

Interestingly, we found that elevated levels of A β_{1-42} correlated with decreased parieto-occipital functional connectivity in HO, but not in aMCI subjects. This result suggests that plasma levels of A β_{1-42} is a better marker of normal aging-related changes in alpha cortical networks than of aMCI-related changes, and, in turn, might be tentatively proposed as a surrogate marker of aging-related decline in cortical function. An alternative explanation for this result is that cognitively normal elderly with elevated concentrations of A β_{1-42} might present a faster cognitive decline rate over time. This hypothesis is supported by

studies showing that an increased A β plaque burden, assessed with [(11)C]Pittsburgh compound B (PiB), is significantly associated with worsening of different cognitive domains (Wirth et al. 2013) and with cortical thinning in clinically normal elderly (Becker et al. 2011). Recent studies have also found significant associations between subjective cognitive complaints and PiB uptake in HO adults (Amariglio et al. 2012), mostly affecting medial prefrontal cortex, cingulate cortex, and precuneus (Perrotin et al. 2012). Subjective cognitive complaints might be related to increased plasma levels of A β_{1-42} in HO subjects, accounting for failures in parieto-occipital functional connectivity observed in our study. Given that the presence of subjective cognitive complaints was not specifically assessed in HO subjects of our study, further investigation needs to be performed to clarify this hypothesis. Furthermore, the sample used in this study was relatively small and lacked in vivo markers of AD pathology (i.e., CSF A β -tau and/or amyloid-PET), impeding confirmation of preclinical AD in our aMCI sample. Therefore, further longitudinal research combining plasma A β and other biomarkers in non-demented older adults and preclinical AD, confirmed by CSF A β and/or amyloid-PET markers, is clearly needed to determine whether plasma A β has diagnostic value in combination with other biomarkers.

Lipid markers correlate with resting-state cortical connectivity patterns in HO and aMCI

Considerable evidence supports a pathogenic link between the deregulation of cholesterol homeostasis and AD (Rohrer et al. 1999; Wood et al. 1999). Early findings have shown that elevated cholesterol levels are an early risk factor for developing AD (Pappolla et al. 2003), sustaining the hypothesis that cholesterol plays a role in promoting amyloidogenesis (Bodovitz and Klein 1996; Simons et al. 1998; Refolo et al. 2000; Grösgen et al. 2010). However, our study is the first in assessing associations between serum lipid levels and oscillatory cortical connectivity in HO and aMCI subjects, and in establishing a link between these markers and macroscopic changes in cerebral regions involved in the generation of the human resting-state alpha rhythm.

We have shown that ApoB levels, the best estimate of circulating lipoproteins with atherogenic potential (Barter et al. 2006), were significantly elevated in aMCI subjects, confirming early findings reported in AD patients (Caramelli et al. 1999). Evidence has shown that high ApoB (Motta et al. 2009) and high LDL cholesterol levels (Lamarche et al. 1996) predict atherogenic alterations. Accordingly, cardiovascular risk factors have been found as predictive markers of faster conversion to AD through different pathophysiological mechanisms derived from

vascular pathology (Tabet et al. 2009; Peters and Beckett 2009). Although triglyceride levels did not differ in our study, their increase was associated with bilateral GM loss in precuneus of aMCI subjects. Evidence has shown significant associations between triglycerides and elevated peripheral A β levels in murine AD models (Burgess et al. 2006), although molecular mechanisms underlying this relationship remain to be fully defined.

Promoting successful cognitive aging is a topic of major importance to the field of public health. Different patterns of cognitive aging have been identified in the last two decades, and there is growing need to better understand what influences these trajectories. For instance, factors that impact cholesterol metabolism, such as dietary intake or physical activity, play an important role in late-life cognitive function and the risk of dementia. In our study, the strength of oscillatory cortical connectivity patterns (mostly in the left hemisphere) of aMCI subjects benefitted from increased levels of HDL, whereas inter-hemispheric connectivity loss in HO was associated with increased levels of total and LDL cholesterol. These results reveal, for the first time, that serum lipid levels in normal and pathological aging relate differently to resting-state functional networks and to macroscopic changes in cerebral sources of alpha rhythms. The relationship between altered lipid metabolism and cognitive function in aging and AD is likely indirect, due to the lack of positive effects of statins on cognitive performance in normal aging (Benito-Leon et al. 2010; Richardson et al. 2013) or their inability to prevent AD (Ancelin et al. 2012; Swiger et al. 2013). In summary, our findings provide a novel framework for establishing cerebral correlates of lipid levels in healthy aging and in older adults with aMCI. Major effort aimed at identifying modifiable cardiovascular risk factors will definitively promote successful cognitive aging and will lead to novel strategies to prevent dementia in the near future.

Acknowledgments This work was supported by research grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2011-25463, PSI2011-24922), the Regional Ministry of Innovation, Science and Enterprise, Junta de Andalucía (P12-CTS-2327), and CIBERNED (CB06/05/1111). The authors declare no competing financial interests.

References

- Amariglio RE, Becker JA, Carmasin J, Wadsworth LP, Lorus N, Sullivan C, Maye JE, Gidyczin C, Pepin LC, Sperling RA, Johnson KA, Rentz DM (2012) Subjective cognitive complaints and amyloid burden in cognitively normal older individuals. *Neuropsychologia* 50:2880–2886
- Ancelin ML, Carrière I, Barberger-Gateau P, Auriacombe S, Rouaud O, Fourlanos S, Berr C, Dupuy AM, Ritchie K (2012) Lipid lowering agents, cognitive decline, and dementia: the three-city study. *J Alzheimers Dis* 30:629–637
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW (1991) The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1:103–116
- Ashburner J (2007) A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage* 38:95–113
- Ashburner J, Friston KJ (2000) Voxel-based morphometry—the methods. *Neuroimage* 11:805–821
- Babiloni C, Ferri R, Moretti DV, Strambi A, Binetti G, Dal Forno G, Ferreri F, Lanuzza B, Bonato C, Nobili F, Rodriguez G, Salinari S, Passero S, Rocchi R, Stam CJ, Rossini PM (2004) Abnormal fronto-parietal coupling of brain rhythms in mild Alzheimer's disease: a multicentric EEG study. *Eur J Neurosci* 19:2583–2590
- Babiloni C, Ferri R, Binetti G, Cassarino A, Dal Forno G, Ercolani M, Ferreri F, Frisoni GB, Lanuzza B, Miniussi C, Nobili F, Rodriguez G, Rundo F, Stam CJ, Musha T, Vecchio F, Rossini PM (2006a) Fronto-parietal coupling of brain rhythms in mild cognitive impairment: a multicentric EEG study. *Brain Res Bull* 69:63–73
- Babiloni C, Frisoni G, Steriade M, Bresciani L, Binetti G, Del Percio C, Geroldi C, Miniussi C, Nobili F, Rodriguez G, Zappasodi F, Carfagna T, Rossini PM (2006b) Frontal white matter volume and delta EEG sources negatively correlate in awake subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Clin Neurophysiol* 117:1113–1129
- Babiloni C, Frisoni GB, Vecchio F, Lizio R, Pievani M, Cristina G, Fracassi C, Vernieri F, Rodriguez G, Nobili F, Ferri R, Rossini PM (2011) Stability of clinical condition in mild cognitive impairment is related to cortical sources of alpha rhythms: an electroencephalographic study. *Hum Brain Mapp* 32:1916–1931
- Babiloni C, Carducci F, Lizio R, Vecchio F, Baglieri A, Bernardini S, Cavado E, Bozzao A, Buttinelli C, Esposito F, Giubilei F, Guizzaro A, Marino S, Montella P, Quattrocchi CC, Redolfi A, Soricelli A, Tedeschi G, Ferri R, Rossi-Fedele G, Ursini F, Scarscia F, Vernieri F, Pedersen TJ, Hardemark HG, Rossini PM, Frisoni GB (2013) Resting state cortical electroencephalographic rhythms are related to gray matter volume in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp* 34:1427–1446
- Babiloni C, Del Percio C, Lizio R, Marzano N, Infarinato F, Soricelli A, Salvatore E, Ferri R, Bonforte C, Tedeschi G, Montella P, Baglieri A, Rodriguez G, Famà F, Nobili F, Vernieri F, Ursini F, Mundi C, Frisoni GB, Rossini PM (2014) Cortical sources of resting state electroencephalographic alpha rhythms deteriorate across time in subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 35:130–142
- Barter PJ et al (2006) Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. *J Intern Med* 259:247–258
- Becker JA, Hedden T, Carmasin J, Maye J, Rentz DM, Putcha D, Fischl B, Greve DN, Marshall GA, Salloway S, Marks D, Buckner RL, Sperling RA, Johnson KA (2011) Amyloid- β associated cortical thinning in clinically normal elderly. *Ann Neurol* 69:1032–1042
- Benito-Leon J, Louis ED, Vega S, Bermejo-Pareja F (2010) Statins and cognitive functioning in the elderly: a population-based study. *J Alzheimers Dis* 21:95–102
- Bishop NA, Lu T, Yankner BA (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464:529–535
- Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Tragl KH, Fischer P (2008) Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging* 29:1–11

- Blesa R, Pujol M, Aguilar M, Santacruz P, Bertran-Serra I, Hernández G, Sol JM, Peña-Casanova J, NORMACODEM Group (2001) Clinical validity of the 'mini-mental state' for Spanish speaking communities. *Neuropsychologia* 39:1150–1157
- Bodovitz S, Klein WL (1996) Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 271:4436–4440
- Braak H, Braak E (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol* 1:213–216
- Brier MR, Thomas JB, Snyder AZ, Benzinger TL, Zhang D, Raichle ME, Holtzman DM, Morris JC, Ances BM (2012) Loss of intranetwork and internetwork resting state functional connections with Alzheimer's disease progression. *J Neurosci* 32:8890–8899
- Burgess BL, McIsaac SA, Naus KE, Chan JY, Tansley GH, Yang J, Miao F, Ross CJ, van Eck M, Hayden MR, van Nostrand W, St George-Hyslop P, Westaway D, Wellington CL (2006) Elevated plasma triglyceride levels precede amyloid deposition in Alzheimer's disease mouse models with abundant A beta in plasma. *Neurobiol Dis* 24:114–127
- Cantero JL, Atienza M, Gomez-Herrero G, Cruz-Vadell A, Gil-Neciga E, Rodriguez-Romero R, Garcia-Solis D (2009a) Functional integrity of thalamocortical circuits differentiates normal aging from mild cognitive impairment. *Hum Brain Mapp* 30:3944–3957
- Cantero JL, Atienza M, Cruz-Vadell A, Suarez-Gonzalez A, Gil-Neciga E (2009b) Increased synchronization and decreased neural complexity underlie thalamocortical oscillatory dynamics in mild cognitive impairment. *Neuroimage* 46:938–948
- Cao L, Schrank BR, Rodriguez S, Benz EG, Moulia TW, Rickenbacher GT, Gomez AC, Levites Y, Edwards SR, Golde TE, Hyman BT, Barnea G, Albers MW (2012) Aβ alters the connectivity of olfactory neurons in the absence of amyloid plaques in vivo. *Nat Commun* 3:1009
- Caramelli P, Nitrini R, Maranhão R, Lourenço AC, Damasceno MC, Vinagre C, Caramelli B (1999) Increased apolipoprotein B serum concentration in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 100:61–63
- Cheng N, Bai L, Steuer E, Belluscio L (2013) Olfactory functions scale with circuit restoration in a rapidly reversible Alzheimer's disease model. *J Neurosci* 33:12208–12217
- De Jong LW, Van der Hiele K, Veer IM, Houwing JJ, Westendorp RG, Bollen EL, De Bruin PW, Middelkoop HA, Van Buchem MA, Van der Grond J (2008) Strongly reduced volumes of putamen and thalamus in Alzheimer's disease: an MRI study. *Brain* 131:3277–3285
- De Munck JC, Gonçalves SI, Huijboom L, Kuijper JP, Pouwels PJ, Heethaar RM, Lopes da Silva FH (2007) The hemodynamic response of the alpha rhythm: an EEG/fMRI study. *Neuroimage* 35:1142–1151
- DeKosky ST, Scheff SW (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457–464
- Di Paolo G, Kim TW (2011) Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci* 12:284–296
- Driscoll I, Troncoso JC, Rudow G, Sojkova J, Pletnikova O, Zhou Y, Kraut MA, Ferrucci L, Mathis CA, Klunk WE, O'Brien RJ, Davatzikos C, Wong DF, Resnick SM (2012) Correspondence between in vivo (11)C-PiB-PET amyloid imaging and post-mortem, region-matched assessment of plaques. *Acta Neuropathol* 124:823–831
- Drzezga A, Becker JA, Van Dijk KR, Sreenivasan A, Talukdar T, Sullivan C, Schultz AP, Sepulcre J, Putcha D, Greve D, Johnson KA, Sperling RA (2011) Neuronal dysfunction and disconnection of cortical hubs in non-demented subjects with elevated amyloid burden. *Brain* 134:1635–1646
- Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA (1987) MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *Am J Roentgenol* 149:351–356
- Feige B, Scheffler K, Esposito F, Di Salle F, Hennig J, Seifritz E (2005) Cortical and subcortical correlates of electroencephalographic alpha rhythm modulation. *J Neurophysiol* 93:2864–2872
- Fischl B, Sereno MI, Dale AM (1999a) Cortical surface-based analysis. II: inflation, flattening, and a surface-based coordinate system. *Neuroimage* 9:195–207
- Fischl B, Sereno MI, Tootell RB, Dale AM (1999b) High-resolution intersubject averaging and a coordinate system for the cortical surface. *Hum Brain Mapp* 8:272–284
- Ghribi O (2008) Potential mechanisms linking cholesterol to Alzheimer's disease-like pathology in rabbit brain, hippocampal organotypic slices, and skeletal muscle. *J Alzheimers Dis* 15:673–684
- Giovacchini G, Lerner A, Toczek MT, Fraser C, Ma K, DeMar JC, Herscovitch P, Eckelman WC, Rapoport SI, Carson RE (2004) Brain incorporation of 11C-arachidonic acid, blood volume, and blood flow in healthy aging: a study with partial-volume correction. *J Nucl Med* 45:1471–1479
- Goldman RI, Stern JM, Engel J Jr, Cohen MS (2002) Simultaneous EEG and fMRI of the alpha rhythm. *Neuroreport* 13:2487–2492
- Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG (2007) Association of low plasma Aβ42/Aβ40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 64:354–362
- Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, Menon V (2004) Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4637–4642
- Grimm MO, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C (2008) Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem* 283:11302–11311
- Grösgen S, Grimm MO, Friess P, Hartmann T (2010) Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1801:966–974
- Hof PR, Morrison JH (2004) The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci* 27:607–613
- Hof PR, Cox K, Morrison JH (1990) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. SUPERIOR frontal and inferior temporal cortex. *J Comp Neurol* 301:44–54
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L (1999) Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3228–3233
- Hughes SW, Lörincz M, Cope DW, Blethyn KL, Kekesi KA, Parri HR, Juhasz G, Crunelli V (2004) Synchronized oscillations at alpha and theta frequencies in the lateral geniculate nucleus. *Neuron* 42:253–268
- Humpel C (2011) Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends Biotechnol* 29:26–32
- Iacono D, Markesbery WR, Gross M, Pletnikova O, Rudow G, Zandi P, Troncoso JC (2009) The Nun study: clinically silent AD, neuronal hypertrophy, and linguistic skills in early life. *Neurology* 73:665–673
- Karas GB, Scheltens P, Rombouts SA, Visser PJ, van Sijndel RA, Fox NC, Barkhof F (2004) Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage* 23:708–716
- Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A (1988) Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 23:138–144

- Koyama A, Okereke OI, Yang T, Blacker D, Selkoe DJ, Grodstein F (2012) Plasma amyloid- β as a predictor of dementia and cognitive decline: a systematic review and meta-analysis. *Arch Neurol* 69:824–831
- Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J, Varela FJ (1999) Measuring phase synchrony in brain signals. *Hum Brain Mapp* 8:194–208
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:796–807
- Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ, Cantin B, Bernard PM, Dagenais GR, Després JP (1996) Apolipoprotein A-I and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five-year follow-up of men in the Québec cardiovascular study. *Circulation* 94:273–278
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6448–6453
- Leritz EC, Salat DH, Williams VJ, Schnyer DM, Rudolph JL, Lipsitz L, Fischl B, McGlinchey RE, Milberg WP (2011) Thickness of the human cerebral cortex is associated with metrics of cerebrovascular health in a normative sample of community dwelling older adults. *Neuroimage* 54:2659–26571
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352–357
- Lopes da Silva F (1991) Neural mechanisms underlying brain waves: from neural membranes to networks. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 79:81–93
- Lopes da Silva F, Van Rotterdam A (1993) Biophysical aspects of EEG and magnetoencephalogram generation. In: Niedermeyer E, Lopes da Silva FH (eds) *Electroencephalography. Basic principles, clinical applications and related fields*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 78–91
- Lopes da Silva FH, van Lierop TH, Schrijer CF, van Leeuwen WS (1973) Organization of thalamic and cortical alpha rhythms: spectra and coherences. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 35:627–639
- Maris E (2004) Randomization tests for ERP topographies and whole spatiotemporal data matrices. *Psychophysiology* 41:142–151
- Martins JJ, Berger T, Sharman MJ, Verdile G, Fuller SJ, Martins RN (2009) Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 111:1275–1308
- Masliah E, Terry R, Buzsáki G (1989) Thalamic nuclei in Alzheimer disease: evidence against the cholinergic hypothesis of plaque formation. *Brain Res* 493:241–246
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD (1993) Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology* 43:192–197
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW Jr, Morris JC (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56:127–129
- Michels L, Moazami-Goudarzi M, Jeanmonod D, Sarntin J (2008) EEG alpha distinguishes between cuneal and precuneal activation in working memory. *Neuroimage* 40:1296–1310
- Miller S, Dykes D, Polesky H (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
- Motta M, Bennati E, Cardillo E, Ferlito L, Passamonte M, Malaguarnera M (2009) The significance of apolipoprotein-B (Apo-B) in the elderly as a predictive factor of cardio-cerebrovascular complications. *Arch Gerontol Geriatr* 49:162–164
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of abeta 1–42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050–4058
- Nickl-Jockschat T, Kleiman A, Schulz JB, Schneider F, Laird AR, Fox PT, Eickhoff SB, Reetz K (2012) Neuroanatomic changes and their association with cognitive decline in mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Brain Struct Funct* 217:115–125
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L (2007) Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55:697–711
- Panza F, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Pichichero G, Capurso SA, Capurso A, Solfrizzi V (2006) Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain Res Rev* 51:275–292
- Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, Girones X, Henry TL, Matsubara E, Zamboni D, Wolozin B, Sano M, Cruz-Sanchez FF, Thal LJ, Petanceska SS, Refolo LM (2003) Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61:199–205
- Pereda E, Quian Quiroga R, Bhattacharya J (2005) Nonlinear multivariate analysis of neurophysiological signals. *Prog Neurobiol* 77:1–37
- Perrotin A, Mormino EC, Madison CM, Hayenga AO, Jagust WJ (2012) Subjective cognition and amyloid deposition imaging: a Pittsburgh Compound B positron emission tomography study in normal elderly individuals. *Arch Neurol* 69:223–229
- Pesini P, Pérez-Grijalva V, Monleón I, Boada M, Tárraga L, Martínez-Lage P, San-José I, Sarasa M (2012) Reliable measurements of the β -amyloid pool in blood could help in the early diagnosis of AD. *Int J Alzheimers Dis* 2012:604141
- Peters R, Beckett N (2009) Hypertension, dementia, and antihypertensive treatment: implications for the very elderly. *Curr Hypertens Rep* 11:277–282
- Petersen PR, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment. Clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56:303–308
- Price JL, Morris JC (1999) Tangles and plaques in nondemented aging and “preclinical” Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45:358–368
- Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL (1991) The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 12:295–312
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7:321–331
- Richardson K, Schoen M, French B, Umscheid CA, Mitchell MD, Arnold SE, Heidenreich PA, Rader DJ, deGoma EM (2013) Statins and cognitive function: a systematic review. *Ann Intern Med* 159:688–697
- Rogers J, Morrison JH (1985) Quantitative morphology and regional and laminar distribution of senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 5:2801–2808
- Roher AE, Kuo YM, Kokjohn KM, Emmerling MR, Gracon S (1999) Amyloid and lipids in the pathology of Alzheimer disease. *Amyloid* 6:136–145
- Rowe CC, Ng S, Ackermann U, Gong SJ, Pike K, Savage G, Cowie TF, Dickinson KL, Maruff P, Darby D, Smith C, Woodward M, Merory J, Tochon-Danguy H, O'Keefe G, Klunk WE, Mathis CA, Price JC, Masters CL, Villemagne VL (2007) Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology* 68:1718–1725

- Rudelli RD, Ambler MW, Wisniewski HM (1984) Morphology and distribution of Alzheimer neuritic (senile) and amyloid plaques in striatum and diencephalon. *Acta Neuropathol* 64:273–281
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ (2006) Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 27:1372–1384
- Schiff SJ (2005) Dangerous phase. *Neuroinformatics* 3:315–318
- Schreckenberger M, Lange-Asschenfeldt C, Lochmann M, Mann K, Siessmeier T, Buchholz HG, Bartenstein P, Gründer G (2004) The thalamus as the generator and modulator of EEG alpha rhythm: a combined PET/EEG study with lorazepam challenge in humans. *Neuroimage* 22:637–644
- Shobab LA, Hsiung GY, Feldman HH (2005) Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 4:841–852
- Silva LR, Amitai Y, Connors BW (1991) Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* 251:432–435
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6460–6464
- Snowdon DA, Nun Study (2003) Healthy aging and dementia: findings from the Nun Study. *Ann Intern Med* 139:450–454
- Sobów T, Flirski M, Kłoszewska I, Liberski PP (2005) Plasma levels of alpha beta peptides are altered in amnesic mild cognitive impairment but not in sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neurol Exp (Wars)* 65:117–124
- Stam CJ, Jones BF, Manshanden I, van Cappellen van Walsum AM, Montez T, Verbunt JPA, de Munck JC, van Dijk BW, Berendse HW, Scheltens P (2006) Magnetoencephalographic evaluation of resting-state functional connectivity in Alzheimer's disease. *Neuroimage* 32:1335–1344
- Stam CJ, Nolte G, Daffertshofer A (2007) Phase lag index: assessment of functional connectivity from multi channel EEG and MEG with diminished bias from common sources. *Hum Brain Mapp* 28:1178–1193
- Storace D, Cammarata S, Borghi R, Sanguineti R, Giliberto L, Piccini A, Pollero V, Novello C, Caltagirone C, Smith MA, Bossù P, Perry G, Odetti P, Tabaton M (2010) Elevation of beta-amyloid 1–42 autoantibodies in the blood of amnesic patients with mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 67:867–872
- Sun X, Bhadelia R, Liebson E, Bergethon P, Folstein M, Zhu JJ, Mwamburi DM, Patz S, Qiu WQ (2011) The relationship between plasma amyloid- β peptides and the medial temporal lobe in the homebound elderly. *Int J Geriatr Psychiatry* 26:593–601
- Swiger KJ, Manalac RJ, Blumenthal RS, Blaha MJ, Martin SS (2013) Statins and cognition: a systematic review and meta-analysis of short- and long-term cognitive effects. *Mayo Clin Proc* 88:1213–1221
- Tabet N, Quinn R, Klugman A (2009) Prevalence and cognitive impact of cerebrovascular findings in Alzheimer's disease: a retrospective, naturalistic study. *Int J Clin Pract* 63:338–345
- Terry RD, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian DS (1981) Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 10:184–192
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572–580
- Tomlinson BE, Blessed G, Roth M (1968) Observations on the brains of non-demented old people. *J Neurol Sci* 7:331–356
- Toth M, Kiss A, Kosztolanyi P, Kondakor I (2007) Diurnal alterations of brain electrical activity in healthy adults: a LORETA study. *Brain Topogr* 20:63–76
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535–539
- Wang Z, Jia X, Liang P, Qi Z, Yang Y, Zhou W, Li K (2012) Changes in thalamus connectivity in mild cognitive impairment: evidence from resting state fMRI. *Eur J Radiol* 81:277–285
- Williams VJ, Leritz EC, Shepel J, McGlinchey RE, Milberg WP, Rudolph JL, Lipsitz LA, Salat DH (2013) Interindividual variation in serum cholesterol is associated with regional white matter tissue integrity in older adults. *Hum Brain Mapp* 34:1826–1841
- Wirth M, Oh H, Mormino EC, Markley C, Landau SM, Jagust WJ (2013) The effect of amyloid β on cognitive decline is modulated by neural integrity in cognitively normal elderly. *Alzheimers Dement* 9:687–698
- Wood WG, Schroeder F, Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U (1999) Recent advances in brain cholesterol dynamics: transport, domains, and Alzheimer's disease. *Lipids* 34:225–234
- Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W (2008) Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis* 29:422–437
- Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O (1983) Development and validation of a geriatric depression scale: a preliminary report. *J Psychiat Res* 17:37–49
- Yotter RA, Doshi J, Clark V, Sojkova J, Zhou Y, Wong DF, Ferrucci L, Resnick SM, Davatzikos C (2013) Memory decline shows stronger associations with estimated spatial patterns of amyloid deposition progression than total amyloid burden. *Neurobiol Aging* 34:2835–2842
- Zhou B, Liu Y, Zhang Z, An N, Yao H, Wang P, Wang L, Zhang X, Jiang T (2013) Impaired functional connectivity of the thalamus in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a resting-state fMRI study. *Curr Alzheimer Res* 10:754–766

